Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor Professor Dr. A. Berghaus

Untersuchungen zur Mutagensensitivität und Reparaturkapazität der Erbinformation von Lymphozyten nierentransplantierter Patienten anhand des Comet Assays und des Mikrokerntests

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von Jeanette Marie-Luise Voigts aus München

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. med. N. Kleinsasser
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. H. Rupprecht
	Priv. Doz. Dr. H. Schmetzer
Mitbetreuung durch die promovierten Mitarbeiter:	
	Prof. Dr med. A. Berghaus
	Dr. med. U. Harréus
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	11. November 2004

1. Einleitung 5

1.1 Einführung in die Problematik der erhöhten Malignominzidenz bei nierentransplantierten Patienten 6

1.1.1 Häufigkeit der verschiedenen Malignomformen bei nierentransplantierten Patienten im Vergleich zur Normalbevölkerung 6

1.1.2 Zeitliches Auftreten der unterschiedlichen Tumorarten 8

1.1.3 Verlaufsmuster maligner Erkrankungen bei nierentransplantierten Patienten im Vergleich zur Normalbevölkerung 8

1.2 Individuelle Disposition und Karzinogenese 9

1.3 Der Comet Assay zum Nachweis fremdstoffinduzierter DNS-Schäden 10

1.4 N-Nitrosodiethylamin (NDEA) als Testsubstanz der Lymphozytenreparaturversuche 12

1.5 Mikrokerntest - Entwicklung und Aussagefähigkeit 13

1.6 Zielsetzung der Arbeit 15

2. Material und Methoden 16

2.1 Patienten- und Kontrollkollektiv 16

2.1.1 Zellspender 16

2.1.2 Anamnesen und Epidemiologie 17

2.2 Methodenspezifische Materialien 18

2.2.1 Chemikalien und Reagenzien 18

2.2.2 Medien und Zusätze 19

2.2.3 Testsubstanz 19

2.2.4 Lösungen 20

2.2.5 Verbrauchsmaterial 22

2.3 Technische Geräte 23

2.4 Methoden 24

2.4.1 Lymphozytenisolierung 24

2.4.2 Lymphozytenreparaturversuch 27

2.4.3 Die alkalische Einzelzellmikrogelelektrophorese (MGE) zum Genotoxizitätsnachweis 30

2.4.4 Auswertung 31

2.4.5 Mikrokerntest zum Nachweis erhöhter Chromosomenbrüchigkeit 33

2.4.6 Statistische Datenanalyse 36

3. Ergebnisse 38

3.1 Charakteristika der Versuchspersonen 38

3.1.1 Altersverteilung von Patienten und Kontrollpersonen 38

3.1.2 Darstellung spezifischer Daten der nierentransplantierten Patienten und der Kontrollpersonen 40

3.2 Mutagensensitivität und DNS-Reparaturfähigkeit bei nierentransplantierten Patienten und Kontrollpersonen 40

3.2.1 Vergleich der Lymphozytenzahlen von Patienten- und Kontrollkollektiv 40

3.2.2 Vergleich der Lymphozytenvitalitäten von Patienten und Kontrollpersonen .. 41

3.2.3 Exemplarische Darstellung des DNS-Migrationsverhaltens im Comet Assay 43

3.2.4 Vergleich der DNS-Migrationen von Patienten und Kontrollpersonen anhand von Mittelwerten und Medianen 46

3.2.5 Vergleich der Mittelwerte und Mediane der DNS-Migrationen von männlichen nierentransplantierten Patienten und Kontrollpersonen 55

3.2.6 Vergleich der Mittelwerte und der Mediane der DNS-Migrationen von weiblichen Nierentransplantierten und Kontrollpersonen 56

3.2.7 Vergleich der Mittelwerte und Mediane der DNS-Migrationen von männlichen und weiblichen nierentransplantierten Patienten 57

3.2.8 Vergleich der Mittelwerte und Mediane der DNS-Migrationen von männlichen und weiblichen Kontrollpersonen 58

3.2.9 Varianzanalyse des Verlaufs der Lymphozytenreparatur anhand der Mittelwerte und Überprüfung der Einflussnahme der Zellvitalitäten auf die DNS-Migration 59

3.2.10 Varianzanalyse des Verlaufs der Lymphozytenreparatur anhand der Mediane und Überprüfung der Einflussnahme der Zellvitalitäten der Lymphozyten auf die DNS-Migration 60

3.2.11 Überprüfung der Einflussnahme von Cyclosporin A auf die DNS-Migration . 61

3.3 Vergleich der Bildung von Mikrokernen bei nierentransplantierten Patienten und Kontrollpersonen 64

3.3.1 Überblick über die Ergebnisse des Mikrokerntests 64

3.3.2 Kolmogorov-Smirnov-Test mit Korrektur nach Lilliefors zur Prüfung der Normalverteilung 65

3.3.3 Mikrokernfrequenz in Abhängigkeit vom Geschlecht 65

3.3.4 Korrelation von Mikrokernfrequenz und Alter 66

3.3.5 Vergleich der Mikrokernfrequenzen von Patienten und Kontrollpersonen 66

3.3.6 Vergleich der Mikrokernfrequenzen von männlichen Nierentransplantierten und Kontrollpersonen 67

3.3.7 Vergleich der Mikrokernfrequenzen von weiblichen Nierentransplantierten und weiblichen Kontrollpersonen 68

3.3.8 Vergleich der Mikrokernfrequenzen von männlichen und weiblichen nierentransplantierten Patienten 68
3.3.10 Überprüfung des Einflusses von Cyclosporin A auf die Mikrokernbildung 69

3.4 Korrelation der DNS-Migration und der Mikrokernbildung 70

3.5 Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse 71
3.5.1 Mutagensensitivität und Reparaturkapazität bei Nierentransplantierten und Kontrollpersonen 71
3.5.2 Vergleich der Bildung von Mikrokernen 73
3.5.3 Korrelation der DNS-Migration und der Mikrokernbildung 73

4. Diskussion 74

4.1 Mutagensensitivität und Reparaturkapazität bei nierentransplantierten Patienten und Kontrollpersonen 74
4.1.1 Einflussnahme von Alter und Geschlecht 74
4.1.2 Vergleich der Lymphozytenzahlen von Patienten und Kontrollpersonen 74
4.1.3 Vergleich der Vitalitäten der Lymphozyten von nierentransplantierten Patienten und Kontrollpersonen 75
4.1.4 Vergleich der Mittelwerte der DNS-Migrationen von nierentransplantierten Patienten und Kontrollpersonen 75
4.1.5 Vergleich der Mediane der DNS-Migrationen von nierentransplantierten Patienten und Kontrollpersonen 77
4.1.6 Varianzanalyse des Verlaufs der Lymphozytenreparatur anhand der Mittelwerte und Mediane der DNS-Migrationen von nierentransplantierten Patienten und Kontrollpersonen 78
4.1.7 Überprüfung der Einflussnahme der Lymphozytenvitalitäten auf die DNS-Migration 79
4.1.8 Diskussion der Ergebnisse der Lymphyzytenreparaturversuche 79
4.1.9 Überpfüfung der Einflussnahme der immunsuppressiven Medikation mit Cyclosporin A auf die DNS-Reparaturkapazität 83

4.2 Vergleich der Bildung von Mikrokernen bei nierentransplantierten Patienten und Kontrollpersonen 86
4.2.1 Mikrokernfrequenz in Abhängigkeit vom Geschlecht 87
4.2.2 Korrelation von Mikrokernfrequenz und Alter 88
4.2.3 Vergleich der Mikrokernfrequenzen von Patienten und Kontrollpersonen 88
4.2.4 Überprüfung des Einflusses von Cyclosporin A auf die Mikrokernbildung 90

4.3 Comet Assay und Mikrokerntest in gemeinsamer Anwendung 91

4.4 Korrelation der DNS-Migration und der Mikrokernbildung 92

4.5 Erklärungsmodelle 94

4.5.1 Die durch die immunsuppressive Therapie bedingte Abwehrschwächung gegenüber entarteten Zellen ... 94
4.5.2 Chronische Antigenstimulation ... 95
4.5.3 Die Rolle onkogener Viren ... 95
4.5.4 Die direkte DNS-Schädigung durch Medikamente und Umweltfaktoren ... 96

4.6 Ausblicke ... 97

5. Zusammenfassung ... 97

6. Anhang ... 100

6.1 Literatur ... 100

6.2 Tabellen ... 106

1. Einleitung

Die Transplantation gesunder Organe als oftmals letzte Therapiemöglichkeit unheilbarer Erkrankungen stellt eine der bedeutendsten Errungenschaften der modernen Medizin dar. Ständige Neuerungen und Verbesserungen auf dem Gebiet der Transplantationschirurgie ermöglichen einer zunehmenden Zahl von Patienten ein längeres Überleben und eine gesteigerte Lebensqualität. Doch eine Verlängerung der Überlebenszeit nach Organtransplantation geht mit einer Erhöhung des Tumorrisikos einher. Seit 1968 erstmals eine gesteigerte Inzidenz von malignen Lymphomen bei Nierentransplantierten festgestellt wurde [Penn, 1969], wuchs die Erkenntnis, dass Organtransplantationen und die damit verbundene immunsuppressive Therapie durch das vermehrte Auftreten bestimmter Malignomarten kompliziert werden [Penn, 1990]. Dabei steigt das Risiko für eine Tumorerkrankung mit zunehmender Transplantationszeit. Der Anteil der an einem Tumorleiden neu erkrankten nierentransplantierten Patienten wird 20 Jahre nach Transplantation in Nordamerika und Europa mit Zahlen zwischen 17 % und 50 % angegeben, in Australien sogar mit 70%.

Ziel dieser Arbeit war es daher, mittels zweier experimenteller Verfahren, nämlich des Comet Assays und des Mikrokerntests, einen Beitrag bei der Suche nach möglichen, auf Ebene der Erbinformation liegenden Ursachen für die erhöhte Zahl maligner Erkrankungen bei Nierentransplantierten zu leisten. Dabei sollte zum einen die Sensitivität der Desoxyribonukleinsäure (DNS) nierentransplantierter Patienten gegenüber Mutagenen sowie Art und Ausmaß der dabei entstehenden Schäden untersucht werden. Zum anderen sollte die Fähigkeit der DNS erfasst werden, diese Schäden mittels der ihr eigenen Reparaturmechanismen wieder zu beseitigen. Darüber hinaus sollte die Genomstabilität dieser Patienten, genauer der Neigung ihrer Chromosomen, Brüche im Bereich ihrer Arme auszubilden, dokumentiert werden. Bei beiden Untersuchungen fanden Lymphozyten als Zellmaterial Verwendung, die von nierentransplantierten Personen und einem Kontrollkollektiv stammten.

1.1 Einführung in die Problematik der erhöhten Malignominzidenz bei nierentransplantierten Patienten

In diesem Abschnitt werden die Zusammenhänge des gehäuften Auftretens maligner Tumoren nach Nierentransplantation erläutert.

1.1.1 Häufigkeit der verschiedenen Malignomformen bei nierentransplantierten Patienten im Vergleich zur Normalbevölkerung

Das besondere Interesse der Forschung nach den Ursachen für das erhöhte Malignomrisiko nach Organtransplantation zielt nicht allein auf die erhöhte Inzidenz maligner Erkrankungen. Vielmehr gilt es bei der Suche nach möglichen Entstehungsmechanismen auch das Verteilungsmuster der unterschiedlichen Formen bösartiger Erkrankungen bei nierentransplantierten Patienten, weil es sich von dem der Normalbevölkerung grundlegend unterscheidet, zu analysieren. Im folgenden Abschnitt wird ein Überblick über die häufigsten Malignomarten bei Nierentransplantierten gegeben.

a. Malignome der Haut: Basalzellkarzinome (Basaliome), Plattenepithelkarzinome, Maligne Melanome

Die Gruppe der Hautmalignome stellt den größten Anteil der bei Nierentransplantierten auftretenden bösartigen Neoplasien dar. Dies gilt insbesondere für Plattenepithelkarzinome, die bei Transplantierten ein für sie eher untypisches Erscheinungsbild zeigen und häufig multipel auftreten. Darüber hinaus ist diese Tumorart bei Transplantierten durch ein bedeutend aggressiveres Wachstum und eine schnellere Metastasierung gekennzeichnet [Penn, 1993]. Während auch Basaliome, die in der Normalbevölkerung vor allem in den höheren Altersgruppen vertreten sind, bei den durchschnittlich jüngeren transplantierten Patienten gehäuft beobachtet werden können [Penn, 1991; Penn, 1993; Bouwes Bavinck et al., 1995], ist die Inzidenz Maligner Melanome kaum erhöht. Eine bedeutende Rolle der UV-Strahlung im Sinne eines Kokarzinogens bei der Karzinogenese dieser Tumorarten wird allseits angenommen [Bouwes Bavinck et al., 1995; Glover et al., 1994].

b. Maligne Lymphome, insbesondere Non-Hodgkin-Lymphome (NHL)

Maligne Lymphome stehen an zweiter Stelle der Tumorerkrankungen Nierentransplantierter und zeigen eine Inzidenzerhöhung um das 28- bis 49-fache gegenüber der Normalbevölkerung. Davon stellen Non-Hodgkin-Lymphome mit bis zu 94% die Hauptgruppe dar, während

deren Anteil in der Normalbevölkerung nur 65% beträgt [Penn, 1993]. Der vorherrschende NHL-Typ bei Transplantierten ist das ansonsten extrem seltene Retikulumzellsarkom, das bei Nierentransplantierten eine Inzidenzerhöhung um das 350-fache zeigt [Penn, 1979]. Oftmals weisen die NHL hierbei multizentrischen Befall des zentralen Nervensystems auf oder nehmen sogar von dort ihren Ausgang [Kinlen et al., 1979; Penn, 1993]. Nicht selten zeigen die Lymphome auch einen Mitbefall des Spenderorgans [Penn, 1990].

c. Malignome der Niere und ableitenden Harnwege

Im Vergleich zur Normalbevölkerung ist auch das Risiko, an Karzinomen der Nieren und ableitenden Harnwege zu erkranken, bei nierentransplantierten Personen erhöht. Hierfür scheint neben der Immunsuppression mitunter auch die zugrundeliegende Nierenerkrankung und die langfristige Dialysebehandlung verantwortlich zu sein [Penn, 1995]. So lässt sich besonders bei Patienten mit Analgetikanephropathie ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Urothelkarzinomen verzeichnen [Kliem et al., 1996]. Bei einem Großteil der Langzeitdialysepatienten entwickelt sich eine erworbene zystische Nierenerkrankung, die mit einer 30- bis 40-fach erhöhten Inzidenz von Adenokarzinomen der Niere einhergeht [Penn, 1995; Almirall, 1990].

d. Tumoren im Hals-, Nasen- und Ohrenbereich

Ein Anstieg der Inzidenzen von malignen Tumoren des Hals-, Nasen- und Ohrenbereichs konnte bei Nierentransplantierten ebenfalls beobachtet werden. Dies gilt insbesondere für Plattenepithelkarzinome der Kopf- und Halsregion. Bevorzugt befallen sind hierbei die vorderen Zungenpartien, der Zungengrund, das Tonsillenbett und der Larynx [Bradford et al., 1990]. Als Kokarzinogene stehen jedoch wie bei Gesunden auch bei Nierentransplantierten das Zigarettenrauchen und der Alkohalabusus im Vordergrund [Bradford et al., 1990]. Bei zahlreichen nierentransplantierten Patienten finden sich zudem Epitheldysplasien der Stimmlippen. Haarzellleukoplakien im Bereich der Mundschleimhaut, die bisher vor allem mit der Infektion durch das Humane Immunodeficiency Virus (HI-Virus) in Zusammenhang gebracht wurden, konnten bei Nierentransplantierten in hoher Zahl beobachtet werden [Kanitakis et al., 1991].

e. Sonstige Tumoren

Weitere häufige Tumorlokalisationen bei Nierentransplantierten betreffen den gynäkologischen Bereich. So finden sich gehäuft Mammakarzinome oder Plattenepithelkarzinome der Cervix uteri. Daneben lassen sich erhöhte Zahlen von Karzinomen des Übergangsepithels im Urogenitaltrakt verzeichnen. Neben diesen auch in der Normalbevölkerung häufig auftretenden malignen Neubildungen, kann jedoch auch eine bemerkenswerte Anzahl seltener

Tumorerkrankungen bei Nierentransplantierten beobachtet werden. Dies gilt beispielsweise für Kaposi-Sarkome, deren Häufigkeit bei Nierentransplantierten mit 3-6 % angegeben wird. Dies entspricht einem 400- bis 500-fach erhöhten Risiko einer Kontrollgruppe derselben ethnischen Zugehörigkeit [Penn, 1991].

1.1.2 Zeitliches Auftreten der unterschiedlichen Tumorarten

Für die einzelnen Malignomformen bei Nierentransplantierten ist ein unterschiedliches zeitliches Auftreten nach der Transplantation charakteristisch. Die kürzeste Latenzzeit hat das Kaposi-Sarkom mit ca. 20 Monaten, gefolgt von den Lymphomen mit durchschnittlich 33 Monaten. Mit zunehmender Dauer der Zeit nach Organtransplantation steigt das Risiko für beide Erkrankungen jedoch nicht weiter an. Hautmalignome treten dagegen oft erst Jahre nach der Transplantation auf. Die längste Latenzzeit haben Plattenepithelkarzinome von Vulva, Skrotum und Perineum mit durchschnittlich 107 Monaten [Penn, 1990]. Allerdings zeigen diese wie auch die Karzinome der Haut eine steigende Inzidenz mit Dauer der Transplantationszeit [Hoover und Fraumeni, 1973]. Somit könnte man auch von einer Zweigipfligkeit des Auftretens der verschiedenen Malignomformen nach Nierentransplantation sprechen.

1.1.3 Verlaufsmuster maligner Erkrankungen bei nierentransplantierten Patienten im Vergleich zur Normalbevölkerung

Die Malignomerkrankungen bei Organtransplantierten zeigen einen rascheren und aggressiveren Verlauf als bei gleichaltrigen Normalpersonen. Eine frühzeitige lymphogene und hämatogene Metastasierung tritt mitunter auch bei solchen Tumorarten auf, die gewöhnlich erst sehr spät Metastasen setzen. Dies trifft für Plattenepithelkarzinome der Haut und Schleimhäute zu [Bottomley et al., 1995; Volgger et al., 1997], aber auch für Nierenzellkarzinome [Katai et al., 1997]. Durch dieses Wachstumsverhalten ergibt sich eine erhebliche Prognoseverschlechterung.

1.1.4 Malignomrisiko unter Langzeitdialyse

Alle nierentransplantierten Patienten dieser Studie waren vor Transplantation über einen Zeitraum von mehreren Monaten bis Jahren Dialyseempfänger. Da auch für Dialysepatienten

ein erhöhtes Risiko für Tumorerkrankungen besteht, soll in diesem Abschnitt kurz auf die Problematik der Malignomentstehung bei Dialysepatienten eingegangen werden.
Eine wesentliche Rolle bei der Entstehung bösartiger Tumore bei Patienten unter Langzeitdialyse wird vor allem der bei Niereninsuffizienz zu beobachtenden Anreicherung von heterozyklischen Aminen im Serum zugeschrieben [Cuckovic et al., 1996]. Dabei ist gerade das Tumorrisiko von Patienten, die unter 35 Jahre alt sind, gegenüber dem älterer Patienten erhöht, bei denen das Risiko nur gering über dem der Normalbevölkerung liegt [Maisonneuve et al., 1999]. Ein Zusammenhang zwischen erhöhter Tumorinzidenz und Art des Dialyseverfahrens wie Hämodialyse, Peritonealdialyse oder beide Arten in Kombination konnte jedoch nicht entdeckt werden [Maisonneuve et al., 1999]. Eine Erhöhung des Malignomrisikos durch die Langzeitimmunsuppression nach Nierentransplantation gegenüber dem unter chronischer Hämodialyse bestehenden Risiko wird in der Literatur verneint [Pecqueux et al., 1990]. Demzufolge soll Immunsuppression nicht zur Erhöhung des Malignomrisikos von Patienten beitragen, die Phasen einer jahrelangen Dialyse mit Urämie ausgesetzt waren [Pecqueux et al., 1990].
Die Häufigkeitsverteilungen der verschiedenen Malignomarten bei Nierentransplantierten und bei Dialysepatienten unterscheiden sich deutlich: Sind es bei den Nierentransplantierten vor allem die Karzinome der Haut, die neben den malignen Lymphomen im Vordergrund stehen, so zeigen die Dialysepatienten ein Überwiegen von Neoplasien des Urogenitaltraktes [Pecqueux et al., 1990]. Als mögliche prädisponierende Faktoren sind hier vor allem die bei niereninsuffizienten Patienten häufig bestehenden angeborenen oder erworbenen Nierenerkrankungen in Betracht zu ziehen. Daneben darf aber auch die Entwicklung von Zystennieren unter Langzeitdialyse, die wiederum ein deutlich erhöhtes Risiko für die Entstehung von Adenokarzinomen der Nieren darstellen, nicht übersehen werden.

1.2 Individuelle Disposition und Karzinogenese

Vererbte genetische Veränderungen können neben zahlreichen exogenen Faktoren ursächlich für die Entstehung von malignen Neoplasien in verschiedenen Zielorganen sein. Somit darf neben der Problematik der Malignomentstehung unter Langzeitimmunsuppression auch die individuelle Disposition eines jeden Patienten nicht außer acht gelassen werden. Genetische Prädispositionen für die Tumorentstehung weisen beispielsweise Personen mit erblichen Syndromen wie Ataxia teleangiectatica oder Fanconi-Anämie auf. Diese sind durch hohe Raten von spontanen Chromosomenbrüchen gekennzeichnet und lassen sich unter dem Oberbegriff der sogenannten Chromosome-Breakage-Syndrome zusammenfassen.

Derartige Schäden kommen bei Gesunden erheblich seltener vor. Doch die Neigung zu erhöhter Chromosomenbrüchigkeit ist nicht die einzige genetische Ursache für ein erhöhtes Malignomrisiko. Hier kommt auch mutagenen Umweltfaktoren große Bedeutung zu. Dabei reagieren verschiedene Personen auf gleiche oder ähnliche Faktoren unterschiedlich. Die Ursache für die individuell unterschiedliche Suszeptibilität gegenüber Umweltkarzinogenen ist auch in der ungleichen Effektivität der DNS-Reparaturmechanismen zu suchen [Setlow, 1984].
Ein wichiges Beispiel für erbliche Hypersensitivität gegenüber einem Umweltmutagen und nachfolgender Krebsentwicklung ist die Erkrankung Xeroderma Pigmentosum, bei der eine Überempfindlichkeit gegenüber UV-Licht als Folge eines genetischen Defekts spezifischer Reparaturenzyme besteht [Hsu, 1987].

1.3 Der Comet Assay zum Nachweis fremdstoffinduzierter DNS-Schäden

Oestling und Johanson entwickelten die Einzelzell-Mikrogelelektrophorese, die ein Bestandteil des Comet Assays ist, 1984 in Uppsala, Schweden, um das Migrationsverhalten der DNS einzelner Zellen nach Bestrahlung zu untersuchen. Fluoreszenzmikroskopisch konnten unter alkalischen Bedingungen Einzelstrangbrüche, unter neutralen Bedingungen Doppelstrangbrüche der DNS nachgewiesen werden. Bereits 1978 war Rydberg und Johanson durch Bestrahlung der Kerne alkalisch lysierter Zellen die Induktion einer Schädigung gelungen, die zur Bestrahlungsintensität direkt proportional war. Weitere Modifikationen erfuhr die Einzelzell-Mikrogelelektrophorese durch Singh et al. [1988] und Kuchenmeister [1991].
Der Comet Assay ist ein quantitatives Verfahren zur Bestimmung von DNS-Schäden in einzelnen, nicht proliferierenden Zellen, die durch mutagene Substanzen und ionisierende Strahlung ausgelöst sein können. Als für dieses Verfahren geeignetes Material kommen praktisch alle zu Einzelzellen auflösbaren Gewebe, unter anderem Lymphozyten, Schleimhautzellen und Fibroblasten in Betracht. Der Comet Assay ermöglicht auch an Biopsien mit relativ geringer Zellzahl innerhalb kurzer Zeit aussagekräftige Messungen. Darüberhinaus lässt diese Methode die Untersuchung von DNS-Reparaturereignissen in einzelnen Zellen zu [Östling und Johanson, 1984; Singh et al., 1988; Kuchenmeister, 1991; Olive et al., 1991]. Diese Anwendungsmöglichkeit fand auch in dieser Arbeit Verwendung. Im Verlauf dieses Verfahrens werden mit Fremdstoffen vorbehandelte Zellen auf speziell vorbereitete Objektträger in Agarose eingebettet. Um frei vorliegende DNS zu erhalten, erfolgt anschließend die Auflösung von Zell- und Kernmembranen durch mehrstündige Aufbewahrung in lytischer Lösung. In der anschließend unter alkalischen Bedingungen durchgeführten Elektrophorese,

zeigt die DNS eine Migration in Anodenrichtung, die proportional zum Ausmaß der zuvor induzierten DNS-Fragmentierung ist.

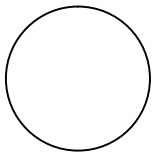


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Punktstruktur der DNS-Migration bei unfragmentierter DNS einer Einzelzelle

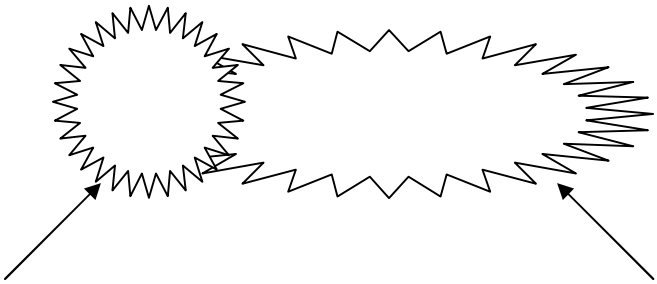


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Kometenform der DNS-Migration bei stärker fragmentierter DNS einer Einzelzelle

Verständlich wird das Migrationsverhalten der DNS in der Elektrophorese, wenn man sich ihre Organisation im Zellkern vor Augen hält. Die DNS, die als Doppelhelix vorliegt, weist noch eine zusätzliche Verdrillung („supercoiling“) auf und ist in dieser Form um Kernproteine mit Stützfunktion, sogenannte Histone gewunden. Durch Kontakt mit genotoxischen Substanzen werden Schäden in den DNS-Strängen in Form von Einzel- und Doppelstrangbrüchen ausgelöst, wodurch es zu einer Lösung der unter Spannung stehenden verdrillten DNS-Schleifen („loops“) kommt. Je mehr Einzelstrangbrüche entstehen, desto stärker ist die Relaxation der DNS und desto länger somit auch die Migrationsstrecke im elektrischen Feld bei der Elektrophorese. Während unbehandelte Zellen bei der Auswertung vorwiegend eine Punktstruktur als Zeichen der nicht oder kaum erfolgten Wanderung während der Elektrophorese aufweisen, stellen sich die mit einer Noxe inkubierten Zellen als Kometen dar. Dabei wird die fragmentierte DNS im Kometenschweif sichtbar. Unterschiede in den DNS-

Migrationen innerhalb eines gleich behandelten Patientenkollektivs lassen sich durch mehrere Faktoren erklären. So kann von Patient zu Patient die Permeabilität der Zellmembran für die verwendete Testsubstanz variieren. Auch die Aktivität der DNS-Reparaturenzyme unterliegt interindividuellen Schwankungen [Singh et al., 1988; Kuchenmeister, 1991].

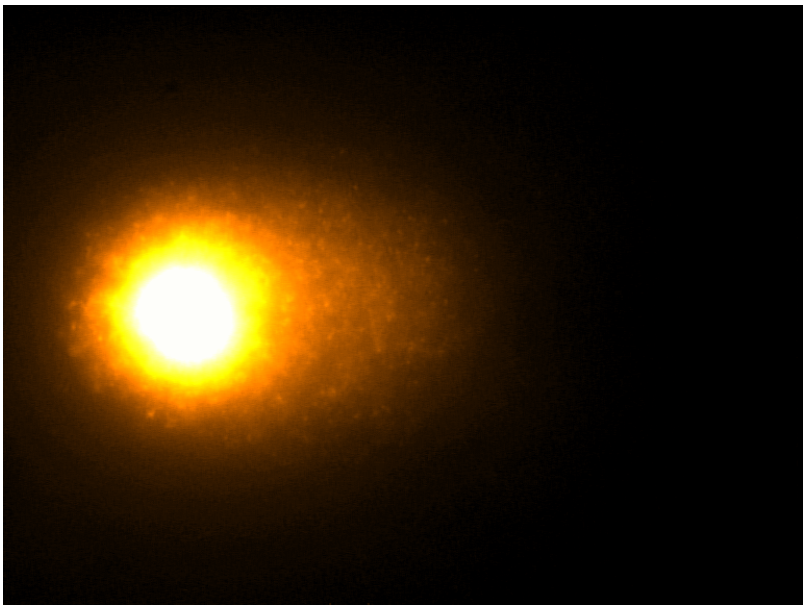


Abbildung 3: Die fragmentierte DNS eines Lymphozyten im Comet Assay

1.4 N-Nitrosodiethylamin (NDEA) als Testsubstanz der Lymphozytenreparaturversuche

In den mittels der Technik des Comet Assays durchgeführten Lymphozytenreparaturversuchen fand N-Nitrosodiethylamin (NDEA) als die DNS schädigendes Agens Verwendung. Bei NDEA, einer N-Nitrosoverbindung, handelt es sich um einen in vielen Substanzen, insbesondere im Tabakrauch, enthaltenen Schadstoff. In zahlreichen Tierexperimenten an verschiedenen Spezies konnte der Nachweis einer krebserzeugenden Wirkung von NDEA, wie auch von zahlreichen anderen N-Nitrosoverbindungen erbracht werden [Schmähl und Habs, 1980; Lewis et al., 1997; Brown-Peterson et al., 1999]. NDEA ist ein multipotentes Karzinogen mit Wirkung auf viele Organe. Dabei besteht ein umgekehrt proportionaler Zusammenhang zwischen verabreichter Dosis und Latenzzeit bis zum Auftreten maligner Transformation [Lewis et al., 1997]. Gerade für den Organotropismus dieser Substanz spielt die täglich verabreichte Dosis eine entscheidende Rolle. Je nach der verabreichten täglichen Dosis wa-

ren bei derselben Tierspezies unterschiedliche Organe betroffen [Schmähl und Habs, 1980]. Dabei spielt der Weg der Inkorporation jedoch keine entscheidende Rolle. NDEA entfaltet unabhängig von oraler, intravenöser, transkutaner, subkutaner oder diaplazentärer Gabe systemische Wirkungen. Daneben ist jedoch auch eine lokale Wirkung am Ort der Applikation möglich [Schmähl und Habs, 1980]. NDEA wird, wie die anderen N-Nitrosoverbindungen auch, in der Leber, die auch das Hauptzielorgan bei der Karzinogenese durch diese Substanz ist [Schmähl und Habs, 1980; Brown-Peterson et al., 1999], über das Cytochrom P450 System metabolisiert. Dabei entstehende Carboniumionen wirken an der DNS und der RNS als Alkylantien und somit direkt kanzerogen [Lewis et al., 1997].

1.5 Mikrokerntest - Entwicklung und Aussagefähigkeit

Der Mikrokerntest ist ein Verfahren zur Erfassung erhöhter Genominstabilität sowohl aufgrund individueller Disposition als auch als Folge der Einwirkung von Noxen. So lässt er sich anwenden, um die Auswirkung bestimmter Substanzen oder Strahlungsarten- und intensitäten auf die Stabilität der DNS (Desoxyribonukleinsäure) im Zellkern zu testen. Aber auch die Genomstabilität unbehandelter Zellen bestimmter Personengruppen lässt sich mit dem Mikrokerntest erfassen. Zu diesem Zweck wurde der Mikrokerntest auch in dieser Arbeit durchgeführt. Als für dieses Verfahren geeignetes Zellmaterial kommen Lymphozyten, Fibroblasten und andere Zelllinien in Betracht. Der Mikrokerntest ist in seiner Anwendbarkeit auf proliferierende Zellen beschränkt, weshalb für seine Durchführung eine mehrtägige Kultivierung der zu untersuchenden Zellen erforderlich wird. Für die Entstehung von Mikrokernen ist eine abgelaufene Karyokinese (Kernteilung) Voraussetzung, wie sie im Rahmen einer normalen Zellteilung (Mitose) erfolgt. Werden im Verlauf einer Kernteilung ganze Chromosomen oder Chromosomenfragmente, wobei es sich vorwiegend um azentrischen Fragmente handelt, nicht in die neu entstehenden Zellkerne aufgenommen, so verbleiben sie als Chromatinpartikel im Zytoplasma der neuen Zelle. Als solche werden sie in der nachfolgenden Interphase sichtbar, also in der Phase zwischen zwei Mitosen. Mikrokerne sind als Ausdruck einer erhöhten genomischen Instabilität zu werten und treten in menschlichen Tumorzellen vermehrt auf [Streffer, 1997].

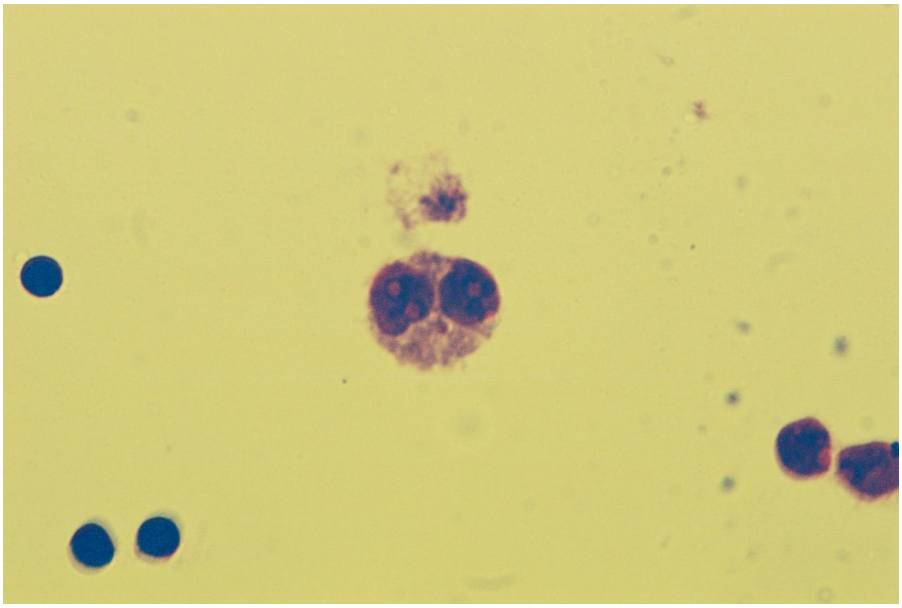
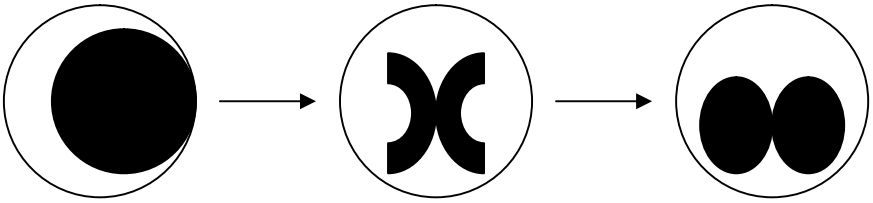
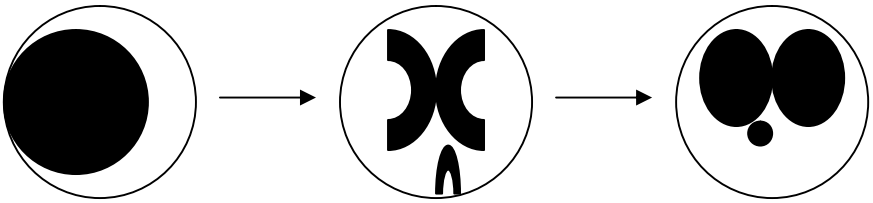


Abbildung 4: Binukleärer Lymphozyt mit Mikrokern



Mitose unter Zusatz von Cytochalasin B ohne Mikrokernbildung: Kernteilung mit Sichtbarwerden der Chromosomen durch Aufspiralisierung der DNS, Entstehung einer binukleären Zelle bei ausbleibender Zytoplasmateilung



Mitose unter Zusatz von Cytochalasin B mit Mikrokernbildung: Kernteilung mit Sichtbarwerden der Chromosomen durch Aufspiralisierung der DNS, Abbruch eines Chromosomenfragments, Entstehung einer binukleären Zelle mit einem Mikrokern

Abbildung 5: Entstehung von Mikrokernen durch Chromosomenbrüche während der Mitose

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die erhöhte Malignominzidenz unter immunsuppressiver Langzeittherapie gewinnt als eine der wichtigsten und gefährlichsten Begleiterscheinungen der Organtransplantation an Bedeutung. Durch die Entwicklung effektiverer immunsuppressiver Medikamente und sicherer Überwachungsmethoden der Transplantatfunktionen ist die Überlebenszeit transplantierter Patienten gestiegen. Organabstoßungsepisoden und Infektionen werden als das Überleben limitierende Faktoren von malignen Neoplasien in den Hintergrund gedrängt. Hauptangriffspunkte der immunsuppressiven Medikation sind die Lymhopoese durch Störung der DNS-Synthese sowie die Lymphozytenmigration durch Hemmung der Bildung lymphozytärer Botenstoffe.

In der vorliegenden Arbeit soll die These überprüft werden, nach der Immunsuppressiva auch die Empfindlichkeit der Erbinformation in der DNS gegenüber Mutagenen erhöhen und die DNS-Reparaturfähigkeit beeinträchtigen. Folgen einer derartigen Wirkung könnten in persistierenden Deletionen, Punktmutationen, Einzel- und Doppelstrangbrüchen oder sogar im Bruch ganzer Chromosomen bestehen, in deren Folge ein Malignom auftreten kann. Die These wird anhand zweier etablierter Methoden, Comet Assay und Mikrokerntest, an peripheren Lymphozyten von nierentransplantierten Patienten und gesunden Kontrollpersonen untersucht.

2. Material und Methoden

Alle Untersuchungen wurden im Labor für klinisch experimentelle Onkologie der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Ludwig-Maximilians-Universität München in den Jahren 2000 bis 2001 durchgeführt.

2.1 Patienten- und Kontrollkollektiv

Im folgenden werden die Zellspender, getrennt nach ihrer Zugehörigkeit zum Kollektiv der nierentransplantierten Patienten oder zum Kontrollkollektiv, dargestellt.

2.1.1 Zellspender

a. Nierentransplantierte Patienten

Die nierentransplantierten Patienten entstammten alle dem Patientengut der Ambulanz für Nierentransplantierte der Station H5 des Klinikums Großhadern und erschienen dort regelmäßig zur Kontrolle von Laborparametern, Transplantatfunktion und Medikation. Die für die Versuche benötigten Lymphozyten wurden aus 20 ml heparinisiertem Vollblut isoliert, das nach vorhergehender Aufklärung und schriftlicher Einverständniserklärung der Patienten im Rahmen einer ohnehin notwendigen Blutentnahme zu diagnostischen Zwecken aus der Vena cubitalis in vorgefertigte heparinisierte Röhrchen entnommen wurde. Vertreten waren 21 Männer und 19 Frauen im Alter von 27 bis 69 Jahren.

b. Kontrollpersonen

Bei der Probensammlung für das Kontrollkollektiv wurde eine möglichst genaue Übereinstimmung von Alter und Geschlecht der 40 Spender mit dem Patientenkollektiv angestrebt. Beteiligt waren 21 Männer und 19 Frauen im Alter von 25 bis 69 Jahren. Ausschlusskriterien für die Patientenauswahl waren anamnestisch erhobene maligne Vorerkrankungen, Langzeitmedikation mit Glukokortikoiden, angeborene oder erworbene Stoffwechselkrankheiten sowie Immundefektsyndrome. Die Kontrollgruppenpersonen entstammten entweder dem Patientengut der Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Ludwig-Maximilians-

Universität München oder waren freiwillige Studienteilnehmer. Im Anschluss an die Aufklärung und schriftliche Einverständniserklärung wurden allen Spendern 20 ml Vollblut aus der Vena cubitalis in vorgefertigte heparinisierte Röhrchen oder 20-ml-Spritzen entnommen.
Die Versuchsdurchführung mit Blutentnahmen zu wissenschaftlichen Zwecken sowie die Formulare zur Patientenaufklärung waren zuvor von der Ethikkommission genehmigt worden (Antrag Nr. 073/ 2000).

2.1.2 Anamnesen und Epidemiologie

a. Nierentransplantierte Patienten

Die erhobenen Daten bezogen sich auf Alter, Geschlecht, Nierenerkrankung, sonstige Erkrankungen, Zeitraum der Dialysepflichtigkeit, Zeitpunkt und Anzahl der Transplantationen, und das immunsuppressive Regime der Patienten.

b. Kontrollpersonen

Die in das Kontrollkollektiv aufgenommenen Personen wurden mittels eines standardisierten Fragebogens zu Alter, Geschlecht, Beruf, Vorerkrankungen, Lebensgewohnheiten und Exposition gegenüber Fremdstoffen befragt.

2.2 Methodenspezifische Materialien

2.2.1 Chemikalien und Reagenzien

Die folgenden Chemikalien und Reagenzien fanden Verwendung:

Chemikalie	**Hersteller**
Aqua ad iniectabilia	Braun, Melsungen
Biocoll Separating Solution	Biochrom KG, Berlin
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz (NA_2EDTA)	Serva, Heidelberg
Giemsa-Lösung	Merck, Darmstadt
Low-Melting-Temperature-Agarose Sea-Plaque^R GTG^R agarose (0,7 %)	FMC-Bioproducts, Rockland, Maine USA
May-Grünwald-Lösung	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma, Steinheim
Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid-Plätzchen (NaOH), wasserfrei	Merck, Darmstadt
N-Laurylsarcosin-Natriumsalz ($C_{21}H_{20}N_3Br$)	Sigma, Steinheim
Normal-Melting-Agarose: Seakem^R LE agarose (0,5 %)	FMC-Bioproducts, Rockland, Maine USA
Puffertabletten für Pufferlösung nach Weise, pH 7,2	Merck, Darmstadt
Trishydroxymethylaminomethan (Trisma-Base) ($C_4H_{11}NO_3$)	Merck, Darmstadt
Triton-X-100 (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol)	Sigma, Steinheim
Trypan Blue Staining 0,4 %, Trypanblau	Gibco BRL Lifetechnologies, Eggenstein

2.2.2 Medien und Zusätze

Als Medien und Zusätze dienten:

Medium oder Zusatz	**Hersteller**
Cytochalasin B	Sigma, Steinheim
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco BRL Lifetechnologies, Eggenstein
Hanks´sche Lösung	Biochrom KG, Berlin
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Sigma, Steinheim
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, ohne Calcium, Magnesium und Sodium Bikarbonate)	Gibco BRL Lifetechnologies, Eggenstein
Phythämagglutintin	Sigma, Steinheim
Rosewell Park Memorial Institute (RPMI): 1640	Biochrom KG, Berlin

2.2.3 Testsubstanz

Als Testsubstanz diente:

Testsubstanz	**Hersteller**
N-Nitrosodiethylamin (NDEA): N-0756 ($C_4H_{10}N_2O$)	Sigma, Steinheim

2.2.4 Lösungen

a. Mikrogelelektrophorese

Agarose	
0,5 % Normal-Melting-Agarose 0,7 % Low-Melting-Agarose	unter kurzem Erhitzen in der Mikrowelle mit PBS lösen und bis zur weiteren Verwendung im Schüttelwasserbad bei 37°C aufbewahren
Lysestammlösung	
146,4 g NaCl (2,5 M) 1,2 g Trizma-Base (10 mM) 37,2 g Na_2EDTA (100 mM) 10 g (1 %) N-Laurosylsarcosin Natrium Salz	auf 1 l Aqua bidest. geben, mischen, anschließend den pH-Wert auf 10 einstellen, bei Raumtemperatur lagern
Lysepuffer	
1 ml Triton X-100 (1 %) 10 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) (10 %) 89 ml Lysestammlösung	unmittelbar vor Verwendung mischen
Elektrophoresepuffer	
24 g NaOH (300 mM) 0,744 g Na_2EDTA (1 mM)	in 2 l Aqua bidest. auflösen, bei 4 °C im Kühlschrank bis zur Verwendung lagern
Neutralisationspuffer	
48,5 g Trizma-Base (400 mM) 990 ml Aqua bidest.	mischen und auf einen pH-Wert von 7,5 einstellen, dann auf 1 Liter auffüllen und bei Raumtemperatur lagern

Färbelösung (Stammlösung)	
10 mg Ethidiumbromid 50 ml Aqua bidest.	Ethidiumbromidlösung bei 4 °C lichtgeschützt aufbewahren, kurz vor dem Versuch eine 1:10 Verdünnung mit Aqua bidest. herstellen, mischen und sterilfiltrieren
Tieffriermedium	
10 % DMSO 90 % FCS	mischen

b. Mikrokerntest: Zellernte

0,075 M KCl-Lösung	
Kaliumchlorid (KCl) Aqua bidest.	Kaliumchlorid in Aqua bidest. lösen, bei Raumtemperatur aufbewahren
Methanol-Eisessig-Fixativ (Verhältnis 3:1)	
750 ml Methanol 250 ml Eisessig	mischen, bei –20° C im Gefrierfach aufbewahren

c. Mikrokerntest: Färbung nach May-Grünwald/Giemsa

Pufferlösung nach Weise	
1 Tablette für Pufferlösung nach Weise 1 l Aqua ad iniectabilia	Tablette in Aqua ad iniectabilia auflösen, bei Raumtemperatur aufbewahren

2.2.5 Verbrauchsmaterial

Folgende Verbrauchsmaterialien kamen zur Anwendung:

Verbrauchsmaterial	**Hersteller**
Deckgläser zum Mikroskopieren (26×76 mm), Glasdicke 0,08-0,12 mm	Langenbrinck, Emmendingen
Einmalspritzen (5 ml, 10 ml)	Becton, Dickinson, Heidelberg
Einwegfiltereinheiten, steril, 0,22µm Filter Unit, Millex^{R}-GV, Millex^{R}-GS	Millipore, Eschborn
Eukitt zur Objektträgereinbettung	Merck, Darmstadt
Immersionsöl zum Mikroskopieren	Merck, Darmstadt
Kryoröhrchen 2 ml, steril	Nalgene, Rochester, NY, USA
Objektträgerkasten aus Polystyrol für 50 Objektträger (26×76 mm)	GLW, Würzburg
Objektträger zum Mikroskopieren (26×76 mm), je 5 mm speziell seitlich mattiert	Langenbrinck, Emmendingen
Objektträger zum Mikroskopieren (24×70 mm), für MKT	Langenbrinck, Emmendingen
Pasteurpipetten, steril	Eppendorf
Pasteurpipetten, unsteril	Eppendorf
Pipettenspitzen, steril	Eppendorf
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf
Röhrchen mit Schraubverschluss (13 ml, 15 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen mit Schraubverschluss (50 ml)	Greiner, Frickenhausen
Schreibdiamant	Renner, Dannstadt
Zellkulturflaschen (20 ml, steril)	Sarstedt, Nümbrecht

2.3 Technische Geräte

Folgende technische Geräte kamen zur Anwendung:

Technisches Gerät	**Hersteller**
Analysenwaage Voyager	Ohaus, Gießen
Auswertung/Datenspeicherung:	Kinetic Imaging, Liverpool
Programm Komet 3.1	
Datenspeicherung	Microsoft Excel
Elektkrophoresenetzgerät E 865	Renner, Dannstadt
Gefrierschrank (-80°C)	New Brunswick Scientific, Nürtingen
horizontale Elektrophoresekammer,	Renner, Dannstadt
Maße: 237×180 mm	
Kühlschrank (+4° C) und Gefrierschrank	Bosch, Stuttgart
Magnetrührer Combimag RCT	IKA, Staufen
Mikroskop: Standardmikroskop	Zeiss, Oberkochen
Fluoreszenzmikroskop DMLB	Leica, Heerbrugg/CH
Filtersystem N 2.1	
Grünanregung BP516-560,	
RKP 580 LP 580	
Objektive 40*/0,5; 10*/0,22; 4*/0,1	
Mikrowelle MWS 2819	Bauknecht, Schorndorf
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
Schüttelwasserbad 1083	GFL, Burgwedel
Schüttler Vortex Genie	Scientific Industries, Bohemia, NY
Sterilbank Herasafe	Heraeus, Hanau
Waage 1419	Sartorius, Gießen
Zählkammer nach Neubauer	Marienfeld
Zentrifuge Varifuge 3,0 RS und 3,0 R	Heraeus, Hanau

2.4 Methoden

Im folgenden Abschnitt werden die in dieser Studie verwendeten Methoden erläutert.

2.4.1 Lymphozytenisolierung

Das für die Lymphozytenisolierung entnommene Vollblut (20 ml) wurde durch Zusatz von Heparin ungerinnbar gemacht. Sofort nach der Entnahme wurde es bei 4 °C gelagert und innerhalb weniger Stunden unter sterilen Bedingungen verarbeitet. Nach Vermischung des Blutes mit 9 ml Phosphat gepufferter Kochsalzlösung (PBS-Lösung; Gibco BRL Lifetechnologies, Eggenstein) und vorsichtiger Umschichtung des PBS-Blutgemischs auf Biocolllösung (Biochrom KG, Berlin) als Trägersubstanz, erfolgte eine 20 minütige Zentrifugation bei 2000 Umdrehungen pro Minute und 24 °C. Die so erhaltene, zwischen Biocollschicht und Plasma schwebende Lymphozytenschicht (Buffycoat) wurde mittels einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt und erneut einem Volumen von 15 ml PBS-Lösung hinzugefügt.

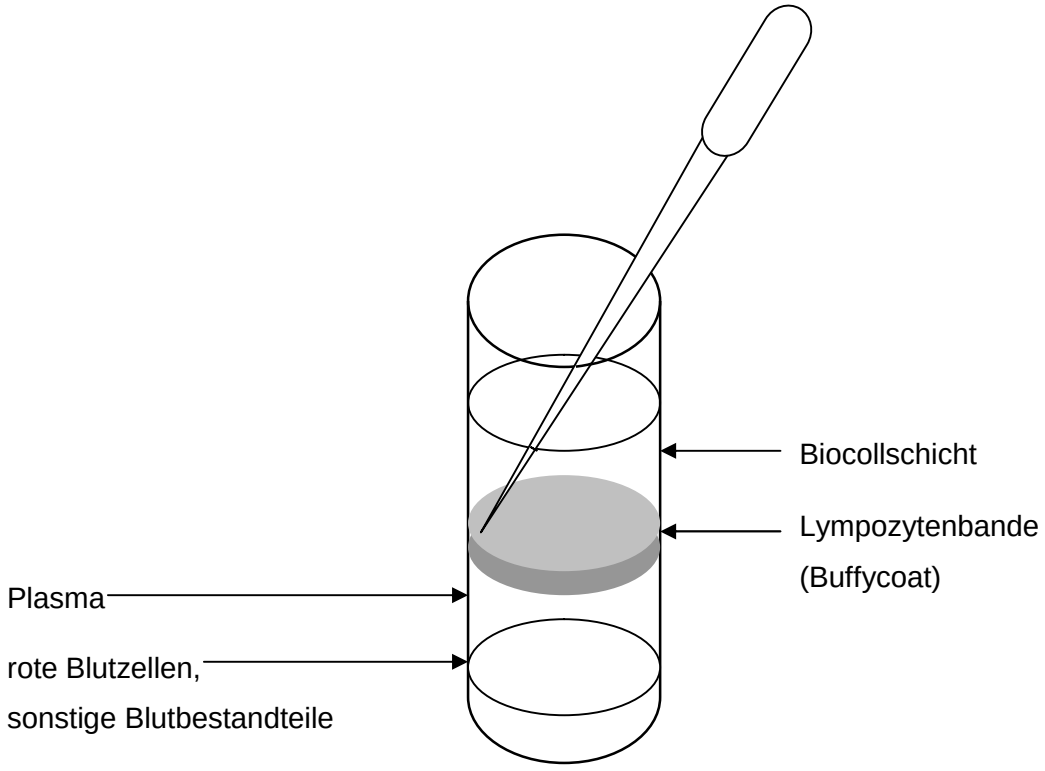


Abbildung 6: Absaugen der Lymphozytenbande (Buffycoat)

Es erfolgte eine weitere 10 minütige Zentrifugation bei 2000 Umdrehungen pro Minute und 24 °C. Nach Abgießen des Überstandes wurde das verbliebene Lymphozytenpellet in fetalem Kälberserum (FCS; Gibco BRL Lifetechnologies, Eggenstein) resuspendiert. Zur anschließenden Zellzählung wurden 50 µl der Lymphozytensuspension und 50 µl Trypanblaulösung (Gibco BRL Lifetechnologies, Eggenstein) vermischt. Ein Tropfen des Gemisches wurde in eine Neubauerzählkammer gegeben und bei 40 facher Vergrößerung wurde die Zellzahl bestimmt. Um in den einzufrierenden Einzelproben eine Konzentration von 2-3×10^6 Lymphozyten pro Milliliter zu erhalten, erfolgte eine der Zellzahl entsprechende Verdünnung der Zellsuspension mit fetalem Kälberserum (FCS). Nach Zugabe von Dimethylsulfoxid in einem Volumen entsprechend 10 % des Ansatzgesamtvolumens (DMSO; Merck, Darmstadt), das zum Schutz der Zellen vor eventueller Schädigung durch das Tieffrieren diente, wurden je 1ml der Zellsuspension unter sterilen Bedingungen in Kryogefäße abgefüllt. Diese wurden in einem Countercooler im Gefrierschrank schonend mit einer Temperaturreduktion von 1°C pro Stunde auf eine Temperatur von - 80 °C abgekühlt. Unter diesen Bedingungen verblieben die Proben bis zur weiteren Verwendung.

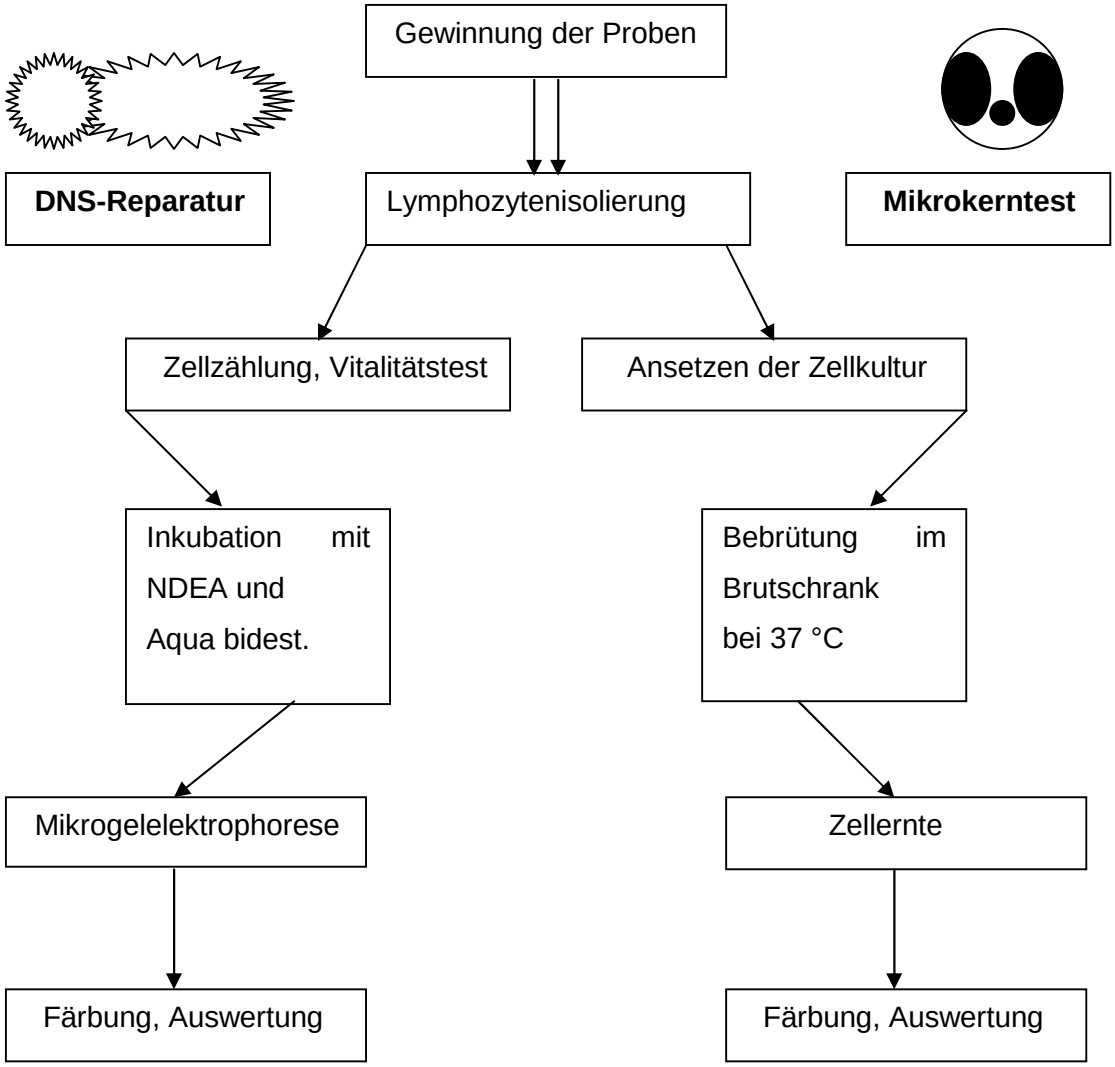


Abbildung 7: Übersicht über die Versuchsabläufe von DNS-Reparatur und Mikrokerntest

2.4.2 Lymphozytenreparaturversuch

a. Auftauen der Probe

Nach Entnahme aus dem Gefrierschrank wurde die Einzelprobe bei Zimmertemperatur langsam aufgetaut, wobei jegliche zellschädigende Tageslichteinstrahlung vermieden und daher fortan bei Rotlicht gearbeitet wurde. Sofort nach dem Auftauen wurde die Zellsuspension in PBS-Lösung überführt und bei 4 °C und 1000 Umdrehungen pro Minute 10 Minuten lang zentrifugiert, um das auf den wiederaufgenommenen Zellstoffwechsel toxisch wirkende Dimethylsulfoxid (DMSO) aus der Zellsuspension auszuwaschen. Es folgte die Aufnahme des so erhaltenen gereinigten Lymphozytenpellets in Rosewell Park Memorial Institute- (RPMI-Medium; Biochrom KG, Berlin) Nährmedium mit Zusatz von Penicillin/Streptomycinlösung (Sigma, Steinheim) und mit einem 15 %igen Anteil von fetalem Kälberserum (FCS).

b. Vitalitätsbestimmung mit dem Trypanblauausschlusstest

Nach Zugabe von 50 µl Zellsuspension zu 50 µl Trypanblaulösung, wurde ein Tropfen dieses Gemisches in eine Neubauerzählkammer abgefüllt. Bei 40-facher Vergrößerung wurden die Gesamtzellzahl sowie der Anteil vitaler Zellen lichtmikroskopisch bestimmt. Zur Unterscheidung vitaler und nichtvitaler Zellen diente der Trypanblauausschlusstest nach Philipps [1973], bei dem sich geschädigte Zellen durch Einstrom von Trypanblaulösung durch die Zellmembran blau anfärben und als solche erkennbar werden. Die Vitalitätsbestimmung erfolgte gemäß der Formel:

Vitalität (%) = ungefärbte Zellen/Gesamtzellen × 100

c. Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte zeitgleich mit der Vitalitätsbestimmung durch Auszählung der in vier Eckquadranten der Neubauerzählkammer enthaltenen Lymphozyten. Die so bestimmte Lymphozytenzahl wurde mit dem Faktor $8x10^4$ multipliziert, wodurch die Anzahl der Lymphozyten in 1 ml der Zellsuspension erhalten wurde.

d. In vitro Applikation der Testsubstanzen und Inkubation

Im Anschluss an die Zellzahlbestimmung wurde die Lymphozytensuspension mit einem entsprechenden Volumen an Rosewell Park Memorial Institute (RPMI-) Medium mit Zusatz von Penicillin/Streptomycinlösung und 15 % igem FCS-Anteil aufgefüllt, um eine Zellkonzentrati-

on von 5–10×10^4 Zellen pro 100 µl Suspension zu erhalten. Je 100 µl dieser Suspension wurden als insgesamt 15 Ansätze auf 15 Lymphozytenröhrchen verteilt, davon entfielen je drei Ansätze auf die Negativkontrolle, drei auf die unmittelbare Schädigung mit 0 Minuten Reparaturzeit, drei auf die Schädigung mit einer Reparaturzeit von 15 Minuten, drei auf die Schädigung mit einer Reparaturintervall von 30 Minuten und drei Ansätze auf die Schädigung mit anschließender 60-minütiger Reparaturzeit (s. Abb. 7). Zwei der drei Ansätze sollten dabei im weiteren Versuchsablauf auf Objektträger aufgebracht und der Mikrogelelektrophorese (MGE) zugeführt werden, der dritte als Vitalitätstest dienen. Als Negativkontrolle fand bidestilliertes Wasser, als schädigendes Agens N-Nitrosodiethylamin (NDEA; Sigma, Steinheim) Verwendung. Nach Zugabe von je 100 µl der entsprechenden Substanzen erfolgte die 60-minütige Inkubation im Schüttelwasserbad bei 37 °C. Um ein Fortdauern der zytotoxischen Einwirkung von NDEA auch während der sich anschließenden Reparaturzeit zu verhindern, wurden die Zellen durch dreimalige Zentrifugation (2000 U/min, 5 min, 4 °C) mit PBS-Lösung von den übrigen Bestandteilen im Nährmedium getrennt. Während die Negativkontrollen und die Ansätze mit 0 Minuten Reparaturzeit sofort auf Objektträger aufgebracht und nochmals die Vitalitäten bestimmt wurden, folgte für die Ansätze mit 15-,30- und 60-minütigem Reparaturintervall noch eine weitere Inkubation bei 37 °C im RPMI-Nährmedium mit 15% FCS von entsprechender Dauer, anschließend nochmals eine Zentrifugation (2000 U/min,5min,4°C).

e. Vitalitätstest

Eine erneute Vitalitätsprüfung mit dem Trypanblauausschlusstest wurde für jeden Ansatz getrennt durchgeführt, um möglicherweise einflussnehmende zytotoxische Effekte von NDEA zu erfassen.

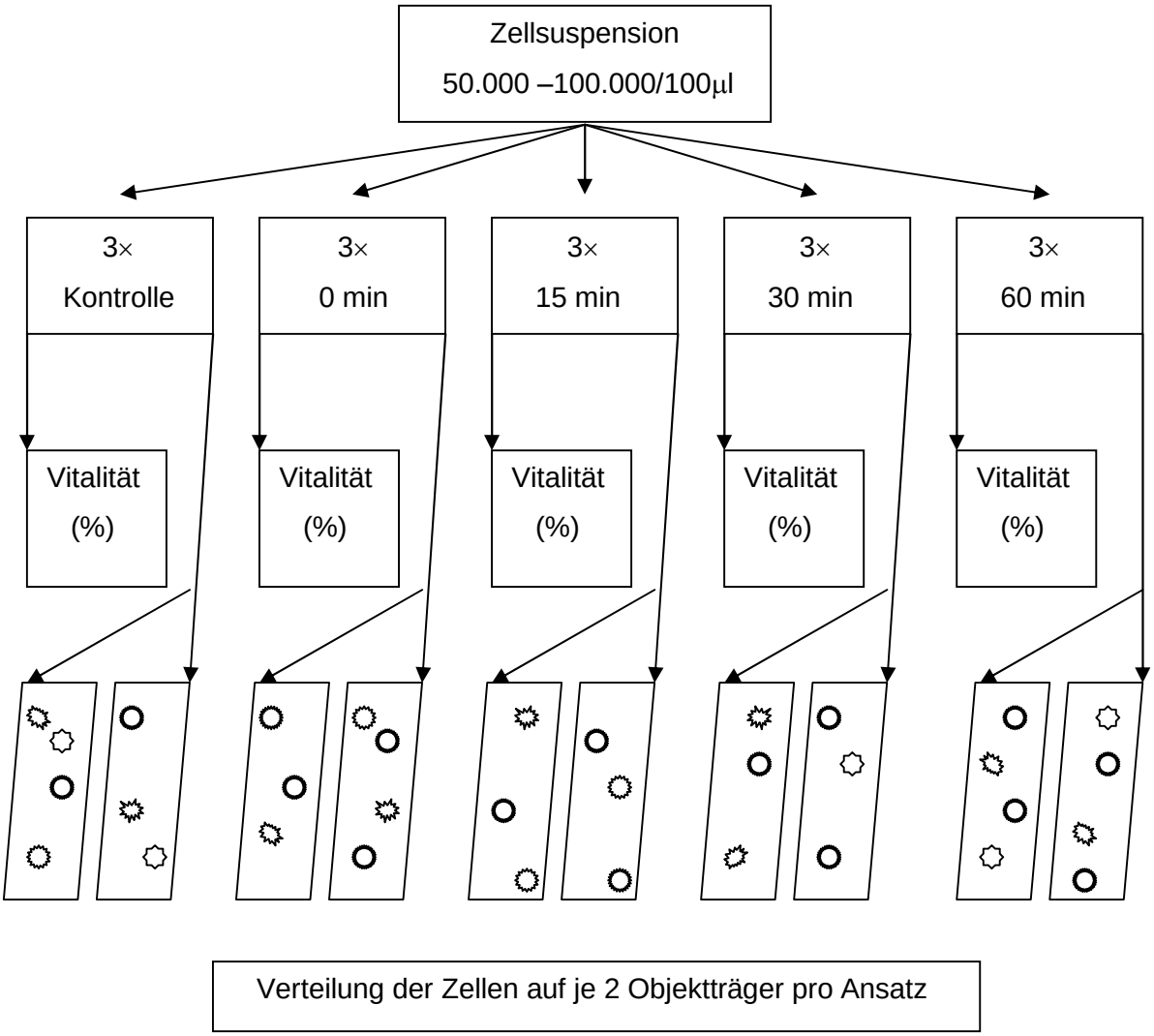


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Funktion der verschiedenen Versuchsansätze: drei Ansätze dienten unter Zusatz von Aqua bidest. als Kontrolle, drei Ansätze wurden zur Bestimmung der DNS-Migrationen unmittelbar nach Schädigung durch NDEA verwendet, je drei Ansätze wurden nochmals 15, 30 und 60 Minuten inkubiert, um die DNS-Migrationen nach diesen Reparaturintervallen zu bestimmen. Von diesen jeweils drei Ansätzen wurden zwei für die spätere Auswertung auf Objektträger aufgebracht, einer diente der Bestimmung der Lymphozytenvitalitäten für den jeweiligen Versuchsschritt.

2.4.3 Die alkalische Einzelzellmikrogelelektrophorese (MGE) zum Genotoxizitätsnachweis

Zur Bestimmung substanzinduzierter DNS-Schäden wie Einzelstrangbrüche und Doppelstrangbrüche wurde die alkalische Einzelzellmikrogelelektrophorese (MGE) [McKelvey-Martin et al., 1993] angewendet. Da zahlreiche Noxen, wie z.B. H_2O_2 2000 mal häufiger Einzel- als Doppelstrangbrüche induzieren, haben sowohl Singh [1988] als auch Kuchenmeister [1991] zum Nachweis der Einzelstrangbrüche die Elektrophorese unter alkalischen Bedingungen durchgeführt. Während humane Lymphozyten-DNS nach Bestrahlung von 25 bis 100 rad im alkalischen Milieu ein gleichmäßiges dosisabhängiges Migrationsverhalten zeigt, konnten dagegen im neutralen Milieu bei vergleichbaren Zellansätzen und Bestrahlungsintensitäten keine DNS-Schädigungen beobachtet werden. Diese Tatsache liegt in der mangelnden DNS-Denaturierung im neutralen pH-Bereich begründet, wodurch es überwiegend zu Doppelstrangbrüchen kommt, die eine geringere Wanderung im elektrischen Feld zeigen. Darüber hinaus wird ein störender Einfluss durch zelluläre RNS durch deren Abbau im alkalischen pH-Bereich verhindert [Singh et al., 1988].

a. Durchführung der alkalischen Einzelzellmikrogelelektrophorese

Vor dem Versuch waren Objektträger vorbereitet worden, die mit je 85 µl einer 0,5% Normal Melting Agarose (NMA; FMC-Bioproducts, Rockland, Maine USA) beschichtet und anschließend luftgetrocknet worden waren. Nach Entfernung der Deckgläser von der getrockneten Agaroseschicht, die eine bessere Haftung aller nachfolgenden Schichten gewährleisten soll, erfolgte die Fixation eines in 75 µl 0,7 % Low Melting Agarose (LMA; FMC-Bioproducts, Rockland, Maine, USA) aufgenommenen Aliquots von 50.000-100.000 Zellen auf dem Objektträger. In einem weiteren Schritt wurden nochmals 85 µl 0,7 % Low Melting Agarose (LMA) auf die vorangegangene Schicht aufgetragen. Eine gleichmäßige Verteilung der Einzelschichten wurde jeweils durch die Auflage eines Deckglases erzielt. Die Festigung der jeweiligen Schichten wurde durch Lagerung der Objektträger auf einer eisgekühlten Metallfläche beschleunigt. Vor jedem neuen Arbeitsgang wurde das Deckglas wieder entfernt. Anschließend wurden die Objektträger in mit Lyselösung gefüllte Glasküvetten gestellt und mindestens eine Stunde lang bei 4 °C unter Lichtabschluss gelagert. Die Lyselösung, die sich aus 89ml Lysestammlösung, 1 ml Triton-X-100 (Sigma, Steinheim) und 10 ml Dimethylsulfoxid (DMSO; Merck, Darmstadt) zusammensetzte, war zuvor hergestellt worden. Diese Aufbewahrung in lytischer Lösung diente der Auflösung der Zell- und Kernmembranen der auf den Objektträgern fixierten Lymphozyten. Somit lag die DNS nunmehr frei vor. Danach folgte die anodennahe Lagerung der Objektträger in einer mit Elektrophoresepuffer gefüllten, horizontal ausgerichteten, 237×180 mm großen Elektrophoresekammer. Der Elektrophore-

sepuffer bestand aus 300 mM NaOH (Merck, Darmstadt) und 1mM Na_2EDTA (Serva, Heidelberg), die in Aqua bidest. gelöst und bei 4°C im Kühlschrank gelagert worden waren. Nach weiterer Auffüllung mit Elektrophoresepuffer und 20 minütiger Ruhezeit, wurde mit der Elektrophorese begonnen (20 min, 25 V, 300 mA). Nach der Elektrophorese wurden die Objektträger wieder aus der Kammer entnommen und zur Neutralisation dreimal in kurzen Abständen mit Neutralisationspuffer aus 400 mM, in Aqua bidest gelöster und auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellter Trizma Base abgespült. Die Anfärbung der denaturierten, entspiralisierten DNS, die je nach Schädigungsgrad in der Elektrophorese unterschiedliche Wanderungsstrecken zurückgelegt hatte, erfolgte durch Auftragen von jeweils 85 µl des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid auf jeden Objektträger. Dieser war unmittelbar zuvor aus Ethidiumbromidstammlösung (aus 10 mg Ethidiumbromid und 50 ml Aqua bidest.) und Aqua bidest. in einem Verdünnungsverhältnis von 1:10 hergestellt und sterilfiltriert worden. Anschließend wurden die Objektträger mit einem Deckglas belegt.

2.4.4 Auswertung

Die Auswertung der Migrationen der angefärbten DNS im Agarosegel auf den Objektträgern erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskop (Leica, Heerbrugg, CH) unter Zuhilfenahme des digitalen Auswertesystems Komet 3.1 (Kinetik Imaging, Liverpool, GB). Als Maß zur Bestimmung der DNS-Schädigung, die sich in Form unterschiedlicher DNS-Migrationen äußerte, diente der Olive Tail Moment [Olive et al., 1991]. Hierbei handelt es sich um das Produkt des Medians der DNS-Wanderungsstrecke und dem Quotienten aus der DNS im Kometenschweif und der Gesamt-DNS, nämlich der im Kopf und Schweif des Kometen enthaltenen DNS. Die Wanderung der DNS-Fragmente, die sich in Form des Kometenschweifes darstellte, korreliert mit dem Fragmentierungsgrad der DNS. Während unbehandelte Zellen bei der Auswertung vorwiegend eine Punktstruktur als Zeichen der nicht oder kaum erfolgten Wanderung während der Elektrophorese aufweisen, stellen sich die mit einer Noxe inkubierten Zellen als Kometen dar. Für jeden Versuchsansatz wurden zwei Objektträger ausgewertet, dabei wurden pro Objektträger 40 Zellen computergesteuert vermessen, insgesamt also 80 Zellen pro Ansatz. Durch Berechnung des Mittelwerts aller 80 Messungen ergab sich ein Gesamt-OTM-Wert pro Versuchsansatz. Dieser liegt allen folgenden Berechnungen zugrunde. Für die Datenspeicherung- und Verarbeitung fand das Programm Microsoft Excel Verwendung. Die OTM-Werte wurden für jeden Versuchsansatz in sechs Gruppen unterteilt (OTM-Werte 0<OTM<2, 2<OTM<5, 5<OTM<10, 10<OTM<20, 20<OTM<30, OTM>30), unter der Voraussetzung, dass OTM-Werte <2 keine, alle übrigen eine zunehmende DNS-Schädigung anzei-

gen sollten. Ferner wurden für jeden Versuchsansatz Durchschnittswert und Median der erhaltenen 80 OTM-Werte errechnet.

Abbildung 9: Die unfragmentierte DNS eines Lymphozyten im Comet Assay

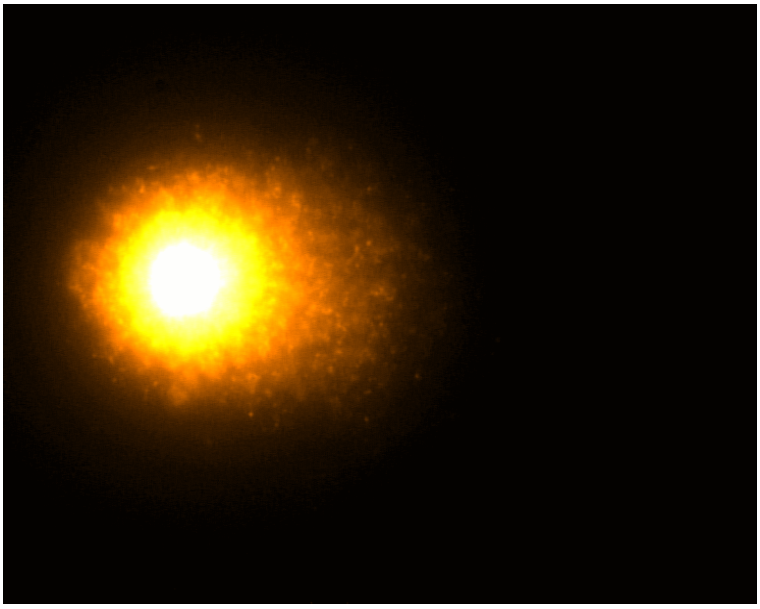


Abbildung 10: Die mittelgradig fragmentierte DNS eines Lymphozyten im Comet Assay

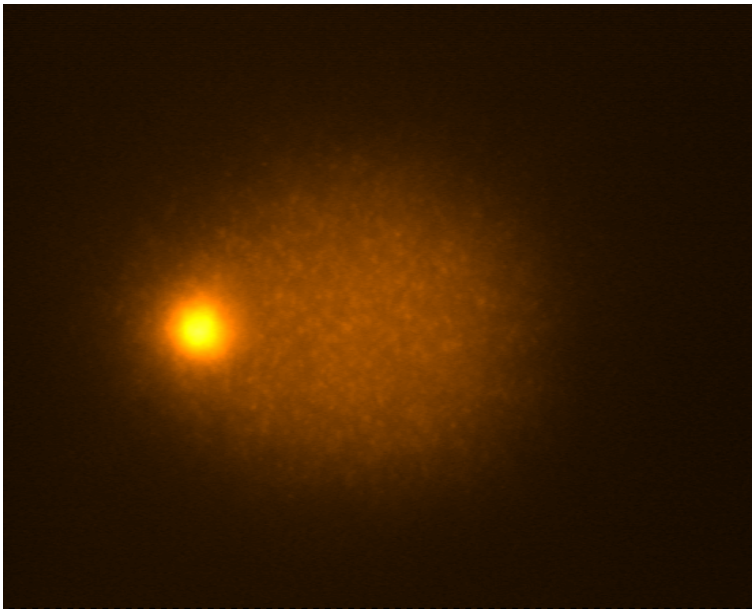


Abbildung 11: Die hochgradig fragmentierte DNS eines Lymphozyten im Comet Assay

2.4.5 Mikrokerntest zum Nachweis erhöhter Chromosomenbrüchigkeit

Der Mikrokerntest an Lymphozyten wurde durchgeführt, um eine erhöhte Brüchigkeit des Genoms auf Chromosomenebene nachzuweisen, die sich im Abbruch kurzer und langer Chromosomenarme, vor allem in Zentromerregion, manifestiert.

a. Auftauen der Proben und Zellzählung

Die bei - 80 °C aufbewahrten Lymphozytenproben wurden aufgetaut und in PBS-Lösung als Waschsubstanz überführt. Danach erfolgte eine dreimalige Zentrifugation bei 4°C und 1200 Umdrehungen pro Minute von 8 Minuten Dauer, jeweils unter Zugabe frischer Waschsubstanz (PBS), um das in den Proben enthaltene zytotoxische Frostschutzmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) möglichst vollständig zu entfernen. Anschließend wurden die Lymphozytenpellets in 1 ml Medium aufgenommen und die Zellzahlbestimmung in der Neubauerzählkammer bei 40-facher Vergrößerung mittels Trypanblaufärbung durchgeführt.

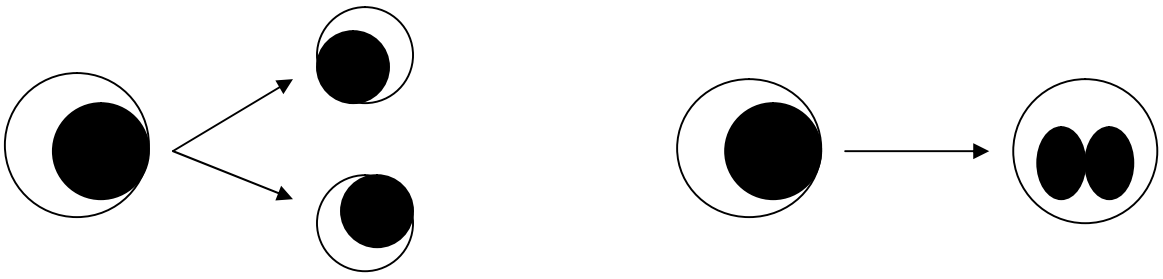
b. Ansetzen der Zellkulturen

Ein Aliquot von ca. $5x10^4$ Zellen/ml wurde mit Medium, bestehend aus 85 % RPMI-Medium, dem Penicillin/Streptomycinlösung zugesetzt war, und 15 % FCS auf ein Volumen von insgesamt 4,9 ml verdünnt und steril in Zellkulturflaschen abgefüllt. Als Wachstumsstimulator

wurden jeder Zellkultur 100 µl Phythämagglutinin (PHA; Sigma, Steinheim) zugesetzt. Es folgte eine 44- bis 46-stündige Ruhezeit im Brutschrank bei 37 °C. Zwischenzeitlich wurden die Zellkulturen unter dem inversen Mikroskop auf Keimfreiheit untersucht, da eine bakterielle Besiedelung mutmaßlich zu einer Veränderung im Zellwachstum und -stoffwechsel führen könnte und somit ausgeschlossen werden musste.

c. Zugabe von Cytochalasin B als Proliferationskontrolle

Nach 44 bis 46 Stunden Bebrütungsdauer erfolgte der Zusatz von 15 µl Cytochalasin B (Cyt B; Sigma, Steinheim), das die Ausbildung der für den Zellteilungsvorgang erforderlichen Mikrotubulistrukturen verhindern sollte. Die Zugabe von Cytochalasin B beruht auf der 1985 durch Fenech und Morley eingeführten „Cytokinesis-Block Method“, durch die der Mikrokerntest modifiziert wurde. Diese ermöglichte eine beträchtliche Verbesserung der Sensitivität und Validität des Mikrokerntests an Lymphozyten, da fortan die Auszählung der Mikrokerne auf binukleäre Zellen beschränkt war [Fenech und Morley, 1985; Fenech und Morley, 1985]. Cytochalasin B (Cyt-B) induziert binukleäre Zellen, indem es die Zytoplasmateilung (Zytokinese) durch Hemmung der Ausbildung der hierfür erforderlichen Mikrotubulistrukturen unterbindet, aber die Kernteilung (Karyokinese) weiterhin gestattet [Gantenberg et al., 1991]. Eine Kontrolle der Zellproliferation wird somit ermöglicht, da zweikernige Zellen genau eine Mitose durchgemacht haben, vierkernige Zellen dagegen zwei Mitosen, usw. Ein falsches Mitzählen von Zellen, die gar keine Zellteilung in Kultur durchgemacht haben und somit auch keine Mikrokerne ausgebildet haben können, wird auf diese Weise verhindert.



Mitose ohne Zugabe von Cytochalasin B:
Entstehung zweier einkerniger Tochterzellen bei normaler Kern- und Zytoplasmateilung

Mitose mit Zugabe von Cytochalasin B:
Entstehung einer zweikernigen Zelle bei Kern-, aber ausbleibender Zytoplasmateilung

Abbildung 12: Wirkung von Cytochalasin B auf die Kernteilung von Lymphozyten

d. Zellernte

Nach weiteren 24-26 Stunden Bebrütungsdauer wurden die Zellkulturen vollständig in je 3 ml Hanksche Lösung (Biochrom KG, Berlin) überführt und zweimal bei 1200 Umdrehungen pro Minute und 24 °C 8 Minuten lang zentrifugiert, um die Zellen von den übrigen Bestandteilen zu reinigen, wobei zwischen den Zentrifugationsvorgängen nochmals je 5 ml frische Hanksche Lösung zugefügt wurden. Nach jeder Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig dekantiert. Durch Zusatz von je 3 ml hyperosmolarer Kaliumchloridlösung und nach erneuter 3-minütiger Zentrifugation bei 800 Umdrehungen pro Minute, wurde eine Schwellung des Zytoplasmas herbeigeführt, um später eine bessere Beurteilbarkeit der Kernstrukturen zu erreichen. Sofort nach der Zentrifugation wurde die Kaliumchloridlösung wieder abgesaugt, um ein Platzen der Zellen zu verhindern. Die Fixierung der Lymphozyten erfolgte durch eine zweimal durchgeführte zehnminütige Inkubation der Lymphozyten mit je 5 ml eines Methanol-Eisessig-Fixatives (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn) im Verhältnis 3:1. Daran schloss sich jeweils eine achtminütige Zentrifugation bei 1200 Umdrehungen pro Minute und 24 °C an. Dies ermöglichte eine Fixierung der Zellen. Nach jeder Zentrifugation wurden die Überstände wieder abgesaugt, wobei die Lymphozytenpellets aber geschont wurden. Zwischen beiden Fixierungsschritten wurden die Lymphozyten mit 5 ml PBS-Lösung gewaschen, indem sie bei 1200 U/min 8 Minuten lang bei 24 °C zentrifugiert wurden. Nach der letzten Zentrifugation wurde das überschüssige Fixativ dekantiert und die Restflüssigkeit unter Schonung des Lymphozytenpellets weitgehend abgesaugt. Danach wurde das Pellet in noch verbliebener Restflüssigkeit resuspendiert. Zuletzt erfolgte die mäanderförmige Auftragung der Zellsuspension auf Objektträger mit anschließender mehrtägiger Lufttrocknung.

e. Färbung nach May-Grünwald und Giemsa

An den getrockneten Objektträgern wurde eine May-Grünwald- und Giemsafärbung durchgeführt. Dazu erfolgte zunächst eine dreiminütiger Anfärbung der Objektträger mit reiner May-Grünwaldlösung (Merck, Darmstadt). Durch eine zwischenzeitliche kurze und kräftige Spülung in Weise-Puffer, der zuvor durch Zugabe einer Puffertablette nach Weise (Merck, Darmstadt) auf einen Liter Aqua bidest hergestellt worden war, wurde überschüssige Färbelösung wieder entfernt. Im Anschluß daran wurden die Objektträger 20 Minuten lang in einem Gemisch aus Weise-Puffer und 5 % Giemsalösung (Merck, Darmstadt) angefärbt. Eine abschließende sorgfältige Spülung in Weise-Puffer diente der Entfernung überschüssigen Farbstoffs von den Objektträgern, so dass nur mehr die Zellen Farbstoff enthielten. Nach Lufttrocknung und lichtmikroskopischer Kontrolle des Färbeergebnisses, wurden die fixierten und gefärbten Lymphozyten auf der Objektträgeroberfläche in Eukitt (Merck, Darmstadt) eingebettet und erneut luftgetrocknet.

f. Auswertung

Die lichtmikroskopische Auswertung erfolgte bei 100-facher Vergrößerung mit Immersionobjektiv unter dem Standardmikroskop (Zeiss, Oberkochen). Pro Versuchsansatz wurden 1000 zweikernige Zellen ausgezählt. Mikrokerne, die als kleine Kerne im Zytoplasma neben den beiden Zellkernen imponierten, wurden notiert und gezählt. Die Auswertung der Mikrokerne erfolgte dabei nach den von Lasne et al.definierten Kriterien [Lasne et al., 1984]. So darf ein Chromatinpartikel nur dann als Mikronukleus klassifiziert werden, wenn das Zytoplasma der gezählten Zelle vollständig erhalten ist. Der Mikrokern muss dabei deutlich im Zytoplasma liegen und rund und scharf begrenzt sein. Auch muss der Mikrokern deutlich von den regulären Zellkernen getrennt und abgegrenzt vorliegen. Dabei sollte seine Farbintensität aber derjenigen der Zellkerne entsprechen. Sind beide Kerne einer binukleären Zelle unterschiedlich groß, so muss der kleinere wenigstens die Hälfte der Größe des Größeren einnehmen. Die als Mikrokerne eingestuften Chromatinpartikel dürfen nicht größer sein als ein Fünftel des kleineren Zellkerns. Das Ergebnis der Auszählung wird in Mikrokernen pro tausend gezählten Zellen angegeben.

2.4.6 Statistische Datenanalyse

Das Programm SPSS^{TM} 11.0 wurde für die statistische Analyse verwendet. Zur Prüfung der Normalverteilung der Versuchsergebnisse wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test mit Korrektur nach Lilliefors angewendet. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney-U Tests zum Vergleich zweier unabhängiger Stichproben bezüglich einer Variablen, des Kruskal-Wallis-Tests zum Vergleich von mehr als zwei unabhängigen Stichproben bezüglich einer Variablen und mit Hilfe der Varianzanalyse über das allgemeine lineare Modell für Messwiederholungen. Verglichen wurden Mittelwerte und Mediane der Versuchsergebnisse. Der Mittelwert ist definiert als der Quotient aus der Summe aller Einzelwerte und der Anzahl dieser Einzelwerte. Der Median ist definiert als der Wert, der in einer Aufreihung der nach zunehmender Größe geordneten Einzelwerte genau in der Mitte dieser Wertereihe liegt. Somit sind 50 % der Werte größer und 50 % der Werte kleiner als der Median. Der Vorteil der Verwendung von Medianen als Rechengröße besteht in der geringeren Beeinflussung der Ergebnisse durch Ausreißer und Extremwerte. Diese gehen in die Mittelwertsberechnung mit ein und können die Ergebnisse beeinflussen.
Als Signifikanzniveau wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner 5 % ($p < 0,05$) gewählt. Ferner wurde zur Prüfung von Korrelationen eine bivariate Korrelationsanalyse mit

Korrelationskoeffizienten nach Pearson verwendet. Hier wurde folgende Einteilung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson zugrunde gelegt:

r bis 0,2	sehr geringe Korrelation
r bis 0,5	geringe Korrelation
r bis 0,7	mittlere Korrelation
r bis 0,9	hohe Korrelation
r über 0,9	sehr hohe Korrelation

Die graphische Darstellung erfolgte mittels Boxplots. Die obere horizontale Begrenzung der Box gibt die obere Quartile an, die untere horizontale Begrenzung dagegen die untere Quartile. Die Box wird somit unten vom ersten und oben vom dritten Quartil (25. bzw. 75. Perzentil) begrenzt. Dies bedeutet, dass 50 % der Werte in der Box liegen, während sich jeweils 25 % der Werte oberhalb und unterhalb der Box befinden. Die waagerechte Linie in der Box stellt den Median dar. Die die Graphik begrenzenden horizontalen T-Linien schränken den gesamten Bereich, in dem die Werte liegen, ein. Sie geben somit den kleinsten und den größten Wert an, sofern es sich hierbei nicht um Ausreißer oder Extremwerte handelt. Ausreißer und Extremwerte werden in der Graphik gesondert vermerkt. Bei Ausreißern handelt es sich um Werte, die um mehr als anderthalb Kastenlängen außerhalb liegen. Diese werden mit einem Kreis gekennzeichnet. Extremwerte liegen um mehr als drei Kastenlängen außerhalb und werden in der Graphik mit einem Stern markiert. Darüber hinaus fanden bei der graphischen Darstellung der Versuchsergebnisse Häufigkeitsdiagramme Anwendung. Diese geben in Form von Säulen die Häufigkeiten bestimmter Werte in einer definierten Gruppe wieder.

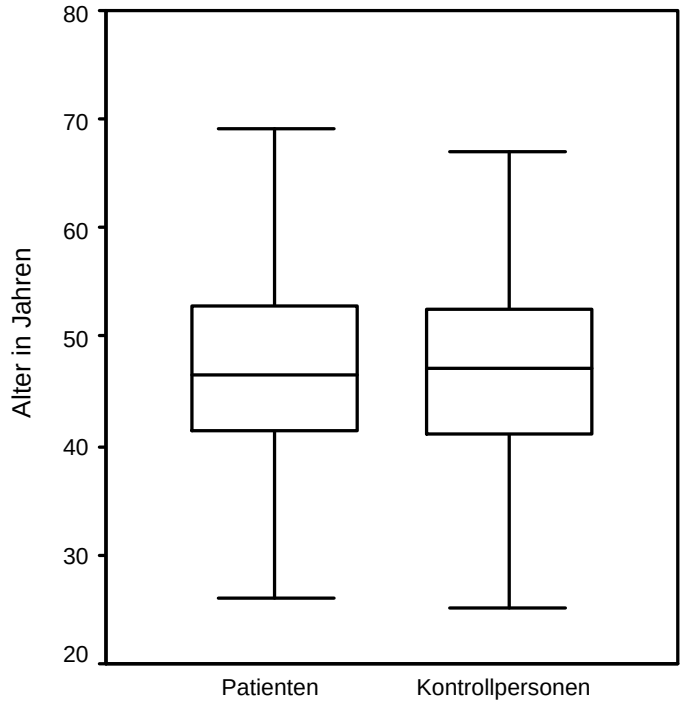
3. Ergebnisse

Im folgenden Abschnitt werden die Versuchsergebnisse dieser Studie dargestellt und statistisch analysiert.

3.1 Charakteristika der Versuchspersonen

3.1.1 Altersverteilung von Patienten und Kontrollpersonen

Im Rahmen der Auswahl der Kontrollpersonen wurde eine individuelle Altersabstimmung von Patienten und Kontrollpersonen durchgeführt.
Die Mittelwerte und Mediane des Alters der je 40 Patienten und Kontrollpersonen lagen bei jeweils 47 Jahren. Der Mittelwert des Alters aller 40 Patienten lag bei 47 Jahren, der Median bei 47 Jahren. Bei der Kontrollgruppe wurde für alle 40 Personen ein Altersmittelwert von 47 Jahren und ein Median von 47Jahren erreicht. Die Anzahl der männlichen Patienten betrug 21, die der weiblichen 19 Personen. Diesen wurden 21 männliche und 19 weibliche Kontrollpersonen gegenübergestellt (s. unter 6., Tabelle 3).



Graphik 1: Boxplotdarstellung der Altersverteilung von Patienten und Kontrollpersonen

Nach Auftrennung des Patienten- und des Kontrollkollektivs nach Geschlechtszugehörigkeiten ergaben sich für das Alter von Patienten und Kontrollpersonen die in nachstehender Tabelle aufgeführten Mittelwerte und Mediane:

Tabelle 1: Mittelwerte und Mediane des Alters von Patienten und Kontrollpersonen getrennt nach Geschlecht

Geschlecht und Status	Altersmittelwert (Jahre)	Altersmedian (Jahre)
männliche Patienten	47	47
männliche Kontrollpersonen	47	47
weibliche Patienten	47	45
weibliche Kontrollpersonen	47	47

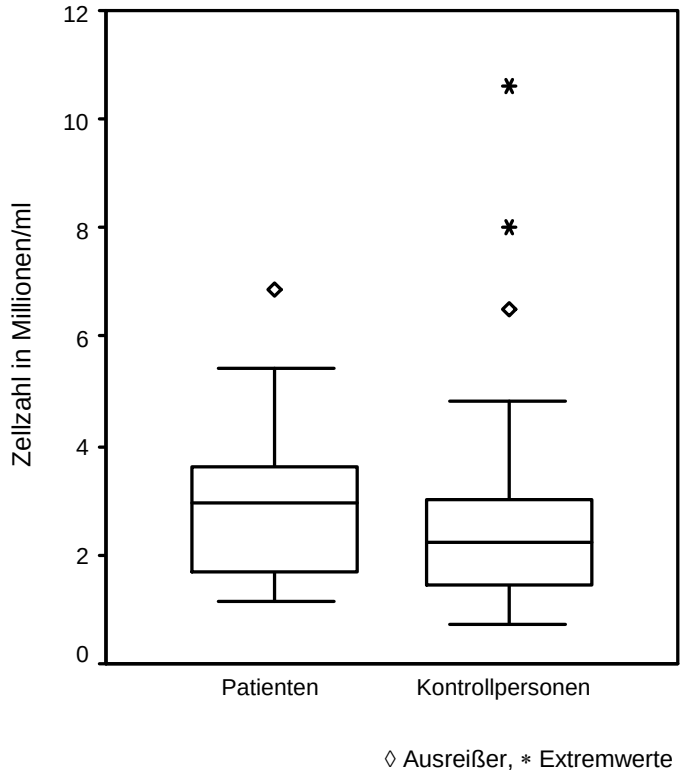
3.1.2 Darstellung spezifischer Daten der nierentransplantierten Patienten und der Kontrollpersonen

Spezifische Daten der nierentransplantierten Patienten bezüglich der Dialyse- und Transplantationsdauer sowie der immunsuppressiven Medikationsschemata wurden für jeden Patienten einzeln erfasst (s. unter 6., Tabellen 1, 2). Dasselbe gilt für spezifische Daten der Kontrollpersonen (s. unter 6., Tabelle 3).

3.2 Mutagensensitivität und DNS-Reparaturfähigkeit bei nierentransplantierten Patienten und Kontrollpersonen

3.2.1 Vergleich der Lymphozytenzahlen von Patienten- und Kontrollkollektiv

Nach Wiederauftauen der unter Zusatz von DMSO als Frostschutzmittel eingefrorenen Proben wurden für jede Probe die in 1 ml Zellsuspension enthaltenen Lymphozyten in der Neubauerzählkammer ausgezählt. Die dabei ermittelte Zellzahl wurde in Millionen pro Milliliter angegeben. Ein Vergleich der Lymphozytenzahlen der nierentransplantierten Patienten mit den Lymphozytenzahlen der Kontrollpersonen wurde durchgeführt.
Der Mittelwert der Lymphozytenzahl lag für das Patientenkollektiv bei 2,89 Millionen pro ml, während sich für das Kontrollkollektiv ein Mittelwert von 2,71 Millionen pro ml ergab. Als Mediane wurden bei den Patienten 2,98 Millionen pro ml, bei der Kontrollgruppe 2,25 Millionen pro ml errechnet. Da sich nach dem Kolmogorov-Smirnov-Test mit Korrektur nach Lilliefors für die Zellzahlen keine Normalverteilung ergab, wurden zur weiteren Analyse nichtparametrische Tests herangezogen. Zwischen den Lymphozytenzahlen von Patienten und Kontrollpersonen ergab sich im Mann-Whitney U-Test für zwei unabhängige Stichproben kein signifikanter Unterschied ($p=0,140$).
Eine Abhängigkeit der Lymphozytenzahl von der Zugehörigkeit zum Patienten- oder Kontrollkollektiv konnte somit nicht nachgewiesen werden.

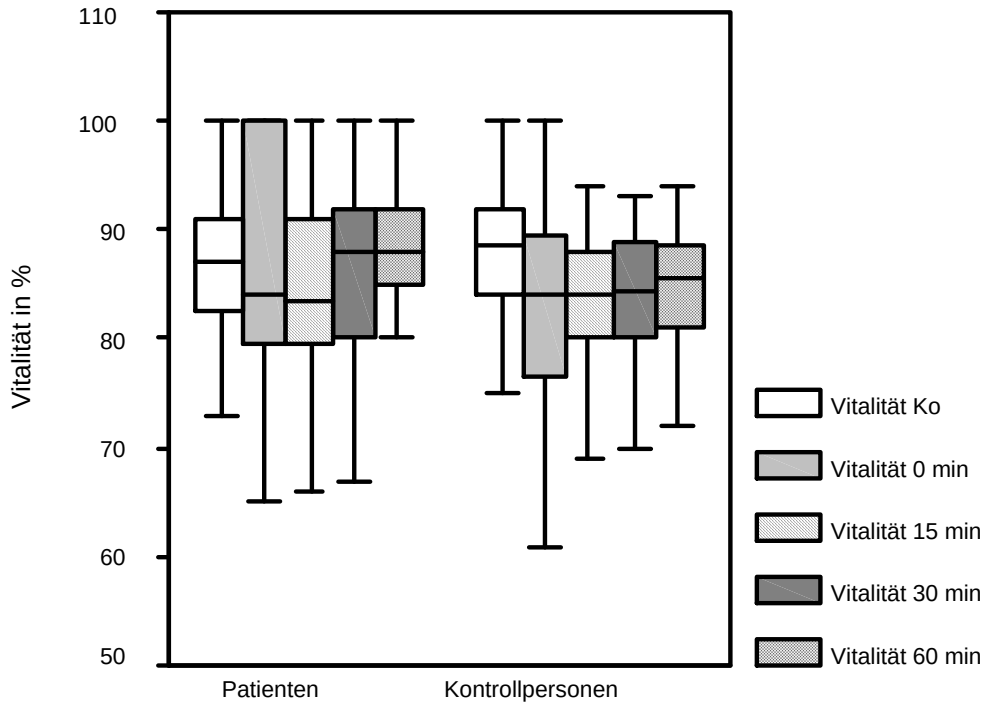


Graphik 2: Boxplotdarstellung der Zellzahlen von Patienten und Kontrollpersonen

3.2.2 Vergleich der Lymphozytenvitalitäten von Patienten und Kontrollpersonen

Sowohl vor Versuchsbeginn als auch nach jedem einzelnen Versuchsabschnitt wurde mittels eines zusätzlichen Ansatzes gleicher Zellkonzentration der prozentuale Anteil vitaler Lymphozyten an der Gesamtzahl der Lymphozyten für jeden Versuchsschritt (Negativkontrolle mit Wasser, 0 min, 15, 30, 60 Minuten Reparaturzeit) bestimmt.
Zur Prüfung der Normalverteilung der Vitalitätszahlen von Patienten- und Kontrollkollektiv wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test mit Korrektur nach Lilliefors verwendet. Da sich keine Normalverteilung ergab, erfolgte die weitere Analyse mittels nicht-parametrischer Tests. Im Vergleich von Patienten- und Kontrollwerten mit dem Mann-Whitney U-Test ergaben sich signifikante Unterschiede (p=0,049) für den Vitalitätstest vor Versuchsbeginn, wobei die Kontrollpersonen mit durchschnittlich 90% vitaler Zellen höhere Vitalitäten aufwiesen als die Nierentransplantierten mit 87% vitaler Zellen. Dagegen zeigten im Vitalitätstest nach 60 Minuten Reparaturdauer die Patienten mit 88 % vitaler Zellen signifikant höhere Werte (p= 0,035) als

die Kontrollgruppe mit nur 85 %. Bei allen anderen Vitalitätstests ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Nierentransplantierten und Kontrollpersonen.



Graphik 3: Boxplotdarstellung der Zellvitalitäten von nierentransplantierten Patienten und Kontrollpersonen im Versuchsverlauf

Tabelle 2: Vergleich der durchschnittlichen Zellvitalitäten von Nierentransplantierten und Kontrollpersonen im Versuchsverlauf mit dem Mann-Whitney U-Test

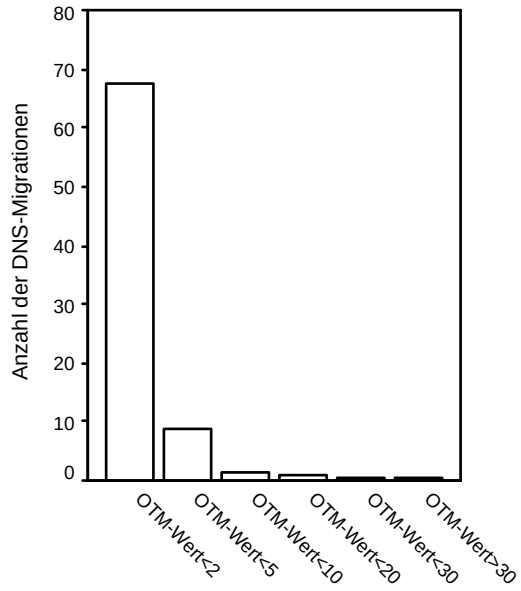
Vitalität in %	Versuchsbeginn	Kontrolle	0 min	15 min	30 min	60 min
Patienten	**87**	86	87	85	86	**88**
Kontrollpersonen	**90**	88	83	84	84	**85**
p-Wert	**0,049**	0,291	0,095	0,570	0,087	**0,035**

Nach Aufteilung von Patienten und Kontrollpersonen nach Geschlechtszugehörigkeit wurden die Vitalitätswerte der Lymphozyten von männlichen Nierentransplantierten und männlichen Kontrollpersonen sowie von weiblichen Nierentransplantierten und weiblichen Kontrollperso-

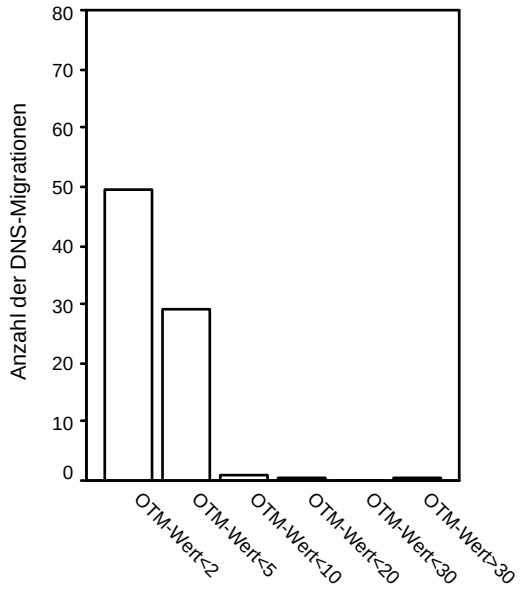
nen mit dem Mann-Whitney U-Test nochmals getrennt miteinander verglichen. Dabei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

3.2.3 Exemplarische Darstellung des DNS-Migrationsverhaltens im Comet Assay

Für jeden Versuchteilnehmer wurden pro Versuchsschritt (Kontrolle mit Aqua bidest., 0 Minuten Reparaturintervall, 15, 30 und 60 Minuten Reparaturintervall) 80 DNS-Migrationen vermessen. Die so erhaltenen 80 OTM-Werte wurden ihrer Größe nach in sechs Gruppen klassifiziert: in OTM-Werte 0<OTM<2, 2<OTM<5, 5<OTM<10, 10<OTM<20, 20<OTM<30 und OTM>30. Die Häufigkeitsverteilungen der OTM-Werte, die sich bei jeweils 80 Messungen für die einzelnen Versuchsansätze ergaben, werden für Nierentransplantierte und Kontrollpersonen anhand der folgenden Diagramme dargestellt.

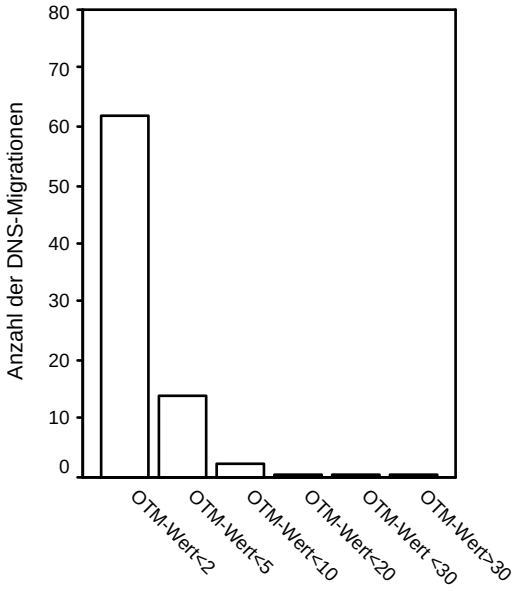


Patienten: vor Inkubation

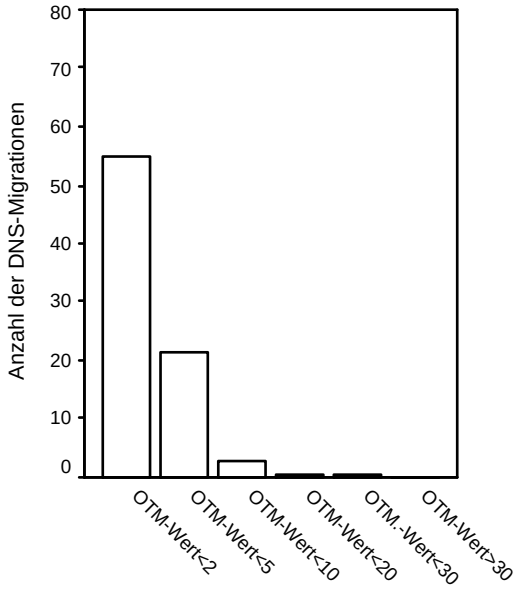


Kontrollpersonen: vor Inkubation

Graphiken 4, 5: Darstellung der DNS-Migrationen anhand von OTM-Wertegruppen, getrennt nach Patienten und Kontrollpersonen vor Inkubation

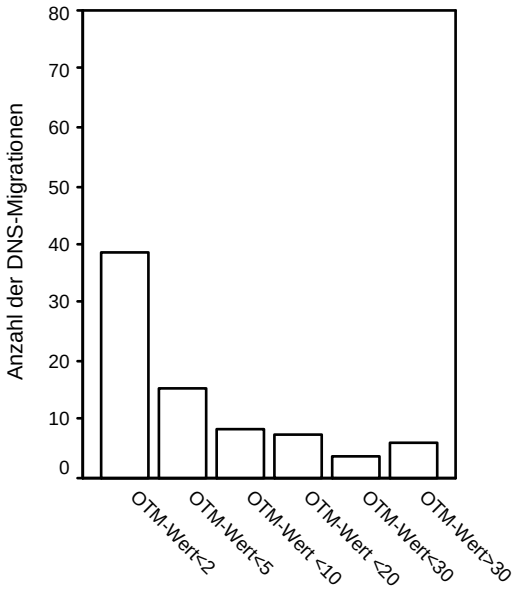


Patienten: Kontrolle mit Aqua bidest.

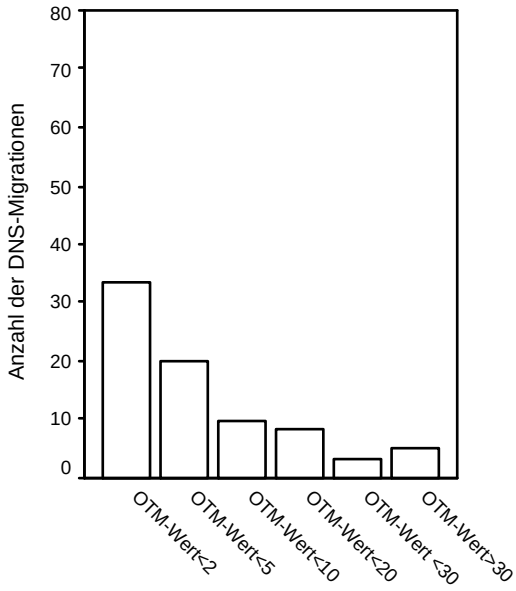


Kontrollpersonen: Kontrolle mit Aqua bidest.

Graphiken 6, 7: Darstellung der DNS-Migrationen anhand von OTM-Wertegruppen, getrennt nach Patienten und Kontrollpersonen für die Kontrolle mit Aqua bidest.

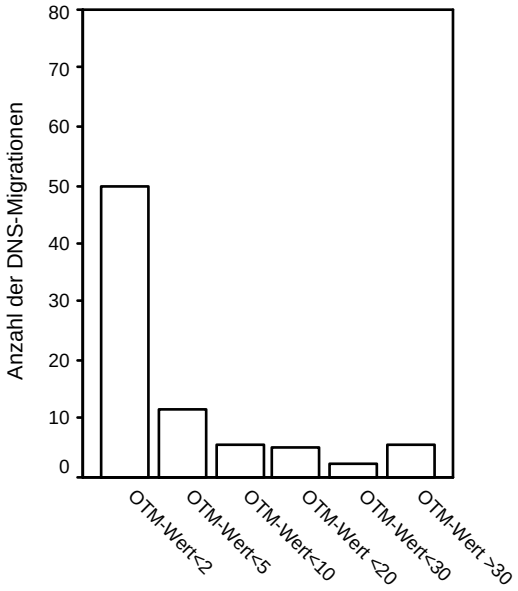


Patienten: 0 min Reparatur

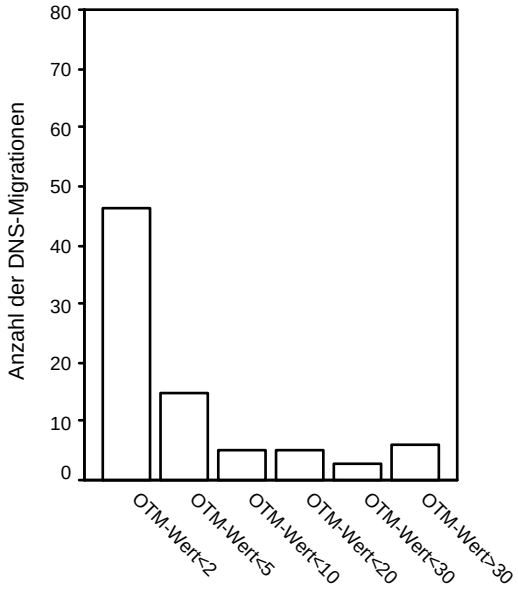


Kontrollpersonen: 0 min Reparatur

Graphiken 8, 9: Darstellung der DNS-Migrationen anhand von OTM-Wertegruppen, getrennt nach Patienten und Kontrollpersonen unmittelbar nach Zugabe von NDEA

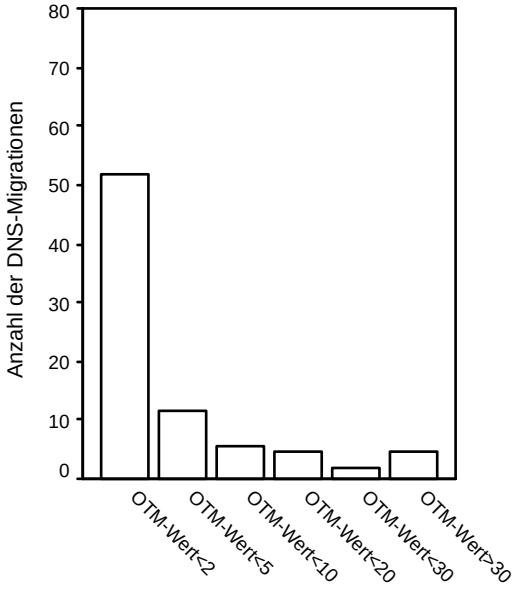


Patienten: 15 min Reparatur

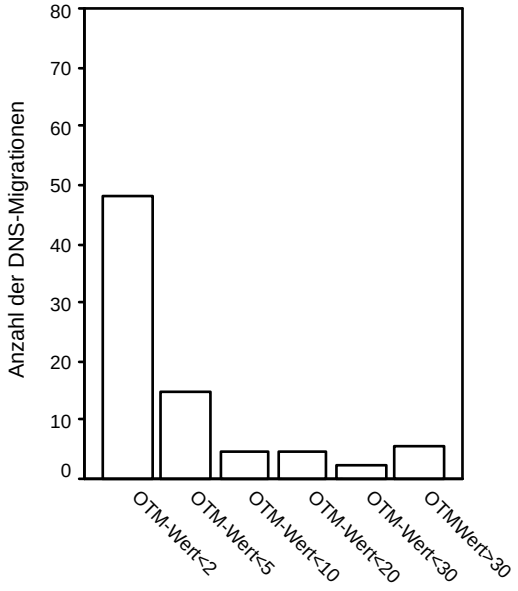


Kontrollpersonen: 15 min Reparatur

Graphiken 10, 11: Darstellung der DNS-Migrationen anhand von OTM-Wertegruppen, getrennt nach Patienten und Kontrollpersonen nach 15 Minuten Reparatur

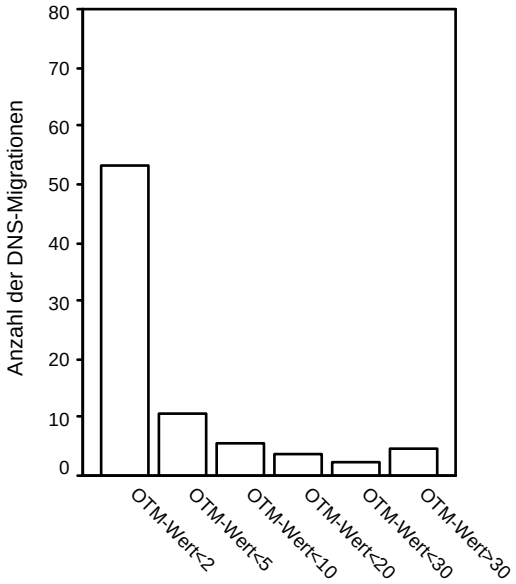


Patienten: 30 min Reparatur

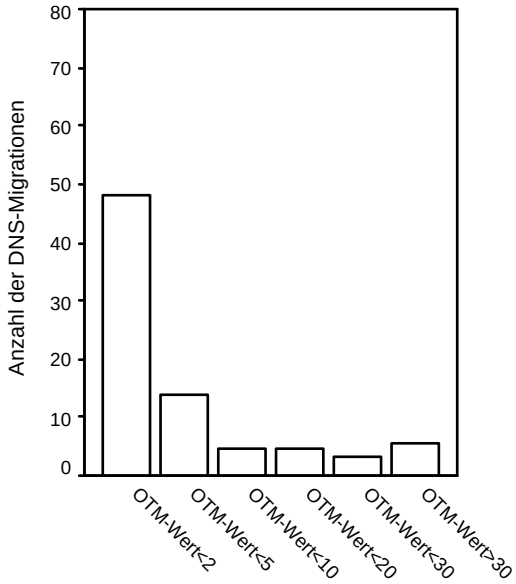


Kontrollpersonen: 30 min Reparatur

Graphiken 12, 13: Darstellung der DNS-Migrationen anhand von OTM-Wertegruppen, getrennt nach Patienten und Kontrollpersonen nach 30 Minuten Reparatur



Patienten: 60 min Reparatur



Kontrollpersonen: 60 min Reparatur

Graphiken 14, 15: Darstellung der DNS-Migrationen anhand von OTM-Wertegruppen, getrennt nach Patienten und Kontrollpersonen nach 60 Minuten Reparatur

3.2.4 Vergleich der DNS-Migrationen von Patienten und Kontrollpersonen anhand von Mittelwerten und Medianen

Die Mittelwerte und Mediane der Lymphozytenreparaturversuche wurden mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test mit Korrektur nach Lilliefors auf Normalverteilung überprüft. Die Analyse der Mittelwerte ergab teils signifikante und damit nicht normalverteilte, teils nicht-signifikante und damit normalverteilte Werte. Ähnlich verhielt es sich bei der Analyse der Mediane von Patienten und Kontrollpersonen. Die graphischen Analysen von Mittelwerten und Medianen mittels Boxplotdarstellung bestätigten dies. Somit war festzustellen, dass für die statistischen Analysen von Mittelwerten und Medianen der einzelnen Versuchsschritte nicht-parametrische Tests zu bevorzugen seien. Die Analyse der Mittelwerte und der Mediane von nierentransplantierten Patienten und Kontrollpersonen erfolgte für die einzelnen Versuchsschritte mit dem Mann-Whitney U-Test für zwei unverbundene Stichproben. Dennoch erschien die Analyse über Messwiederholungen im Rahmen des allgemeinen linearen Modells zulässig, da hier der Grundsatz der Robustheit der Varianzanalyse gegenüber Abweichungen von der Normalverteilung zum Tragen kommt.

Tabelle 3: Prüfung der Mittelwerte von Patienten und Kontrollpersonen auf Normalverteilung mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test mit Korrektur nach Lilliefors

Kolmogorov-Smirnov-Test[a]	vor Inkubation	Kontrolle	0 min	15 min	30 min	60 min
Patienten (p-Wert)	<0,001	<0,001	0,033	0,200	0,037	0,042
Kontrollgruppe (p-Wert)	0,200	0,200	0,200	0,004	0,200	0,200

[a] mit Korrektur nach Lilliefors

Tabelle 4: Prüfung der Mediane von Patienten und Kontrollpersonen auf Normalverteilung mit dem Kolmogrov-Smirnov-Test mit Korrektur nach Lilliefors

Kolmogorov-Smirnov-Test[a]	vor Inkubation	Kontrolle	0 min	15 min	30 min	60 min
Patienten (p-Wert)	0,200	0,200	<0,001	0,200	0,013	0,200
Kontrollgruppe (p-Wert)	0,200	<0,001	0,073	<0,001	<0,001	<0,001

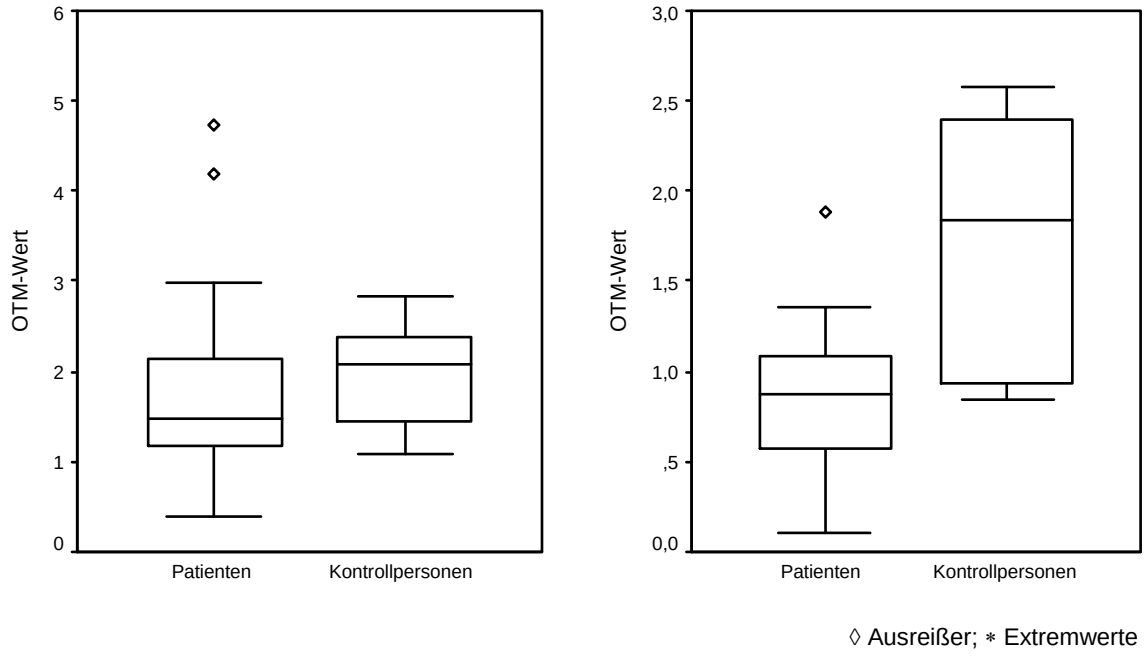
a mit Korrektur nach Lilliefors

Die Mittelwerte und Mediane der DNS-Migrationen von nierentransplantierten Patienten und Kontrollpersonen wurden für jeden Versuchsabschnitt mit dem Mann-Whitney U-Test für zwei unabhängige Stichproben miteinander verglichen. Zur Veranschaulichung der Versuchsergebnisse von Patienten und Kontrollpersonen bei jedem Versuchsabschnitt sollen die Boxplotdarstellungen im folgenden Abschnitt beitragen. Dabei werden Mittelwerte und Mediane getrennt einander gegenübergestellt. Die nachfolgenden Tabellen sollen eine bessere Übersicht über die analysierten Wertepaare liefern.

a. Vergleich der DNS-Migrationen vor Inkubation

Die Lymphozyten der Kontrollgruppe zeigten einen OTM-Mittelwert von 2,02, die Patientenlymphozyten einen Mittelwert von 1,71. Die Werte unterschieden sich nicht signifikant (p=0,182).

Der Vergleich der Mediane der OTM-Werte ergab signifikant höhere Werte (p=0,005) bei der Kontrollgruppe mit einem Median von 1,72 als bei den Nierentransplantierten mit einem Median von 0,85.



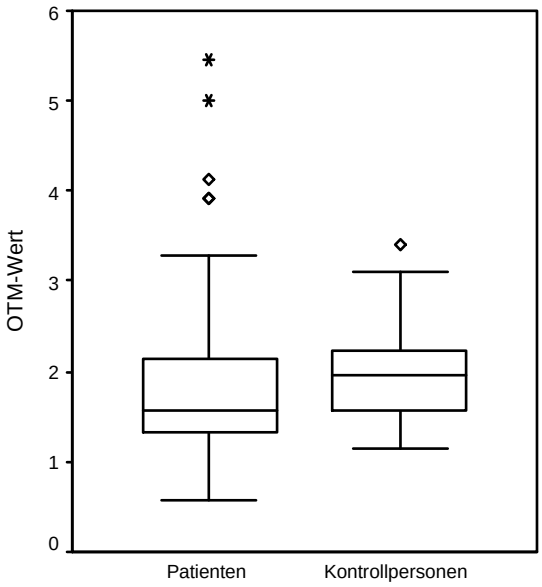
Mittelwerte: vor Inkubation

Mediane: vor Inkubation

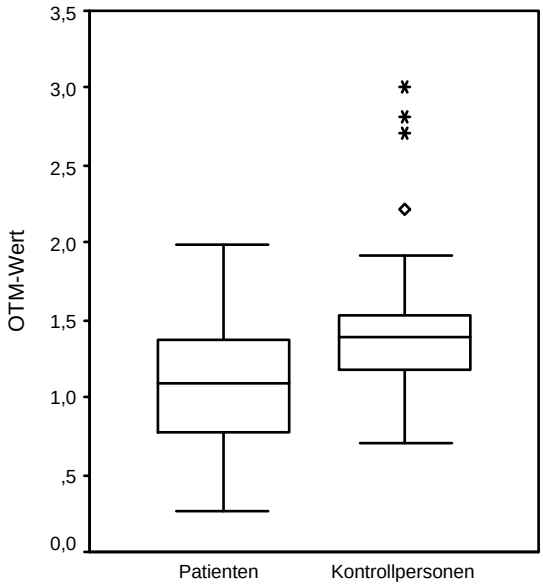
Graphiken16, 17: Boxplotdarstellungen der OTM-Mittelwerte und der Mediane vor Inkubation, getrennt nach Patienten und Kontrollpersonen

b. Vergleich der DNS-Migrationen von Patienten und Kontrollpersonen für die Kontrolle mit Aqua bidest.

Der OTM-Mittelwert für die Kontrolle mit Aqua bidest. lag bei den Patienten bei 1,99, bei der Kontrollgruppe bei 1,97. Die Analyse mit dem Mann-Whitney-U-Test ergab keinen signifikanten Unterschied (p=0,103) im Migrationsverhalten der Lymphozyten-DNS beider Gruppen.
Beim Vergleich der Mediane ergab sich bei der Kontrolle mit Aqua bidest. für die Gruppe der Nierentransplantierten mit einem Median von 1,09 ein signifikant niedrigerer Wert (p<0,001) als für die Kontrollgruppe mit einem Median von 1,46.



Mittelwerte: Kontrolle mit Aqua bidest.



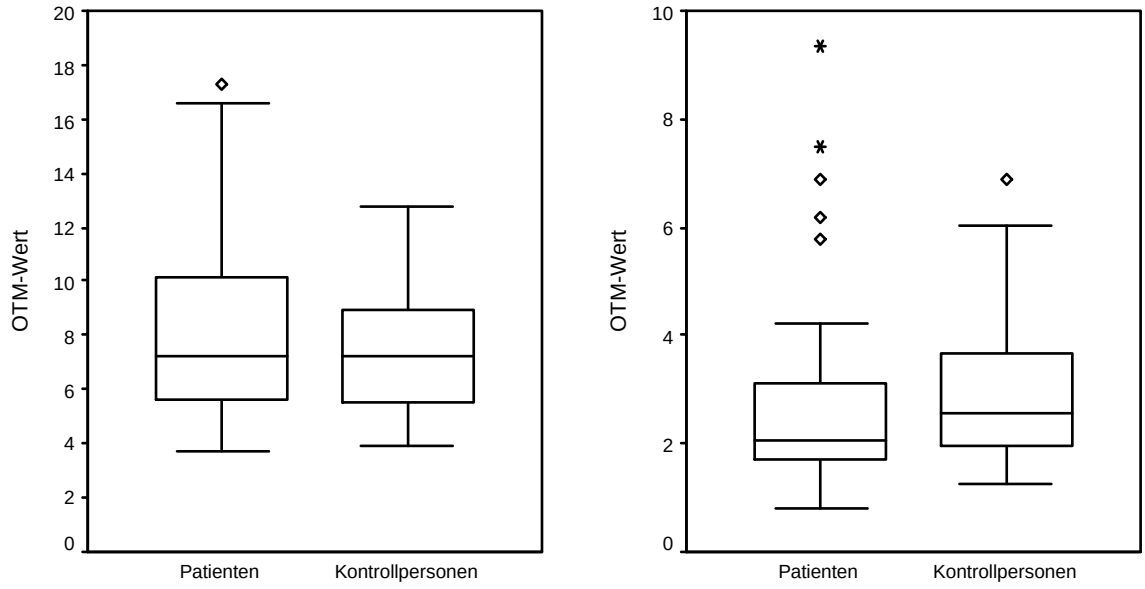
◊ Ausreißer; ∗ Extremwerte

Mediane: Kontrolle mit Aqua bidest.

Graphiken 18, 19: Boxplotdarstellungen der OTM-Mittelwerte und der Mediane für die Kontrolle mit Aqua bidest., getrennt nach Patienten und Kontrollpersonen

c. Vergleich der DNS-Migrationen unmittelbar nach Schädigung

Die Patienten zeigten unmittelbar nach Schädigung durch NDEA einen OTM-Mittelwert von 8,33, die Kontrollgruppe einen Wert von 7,48. Dieser Werteunterschied stellte sich als nicht signifikant dar (p=0,522).
Auch die Mediane von Patienten und Kontrollpatienten zeigten unmittelbar nach Zugabe der schädigenden Substanz NDEA keinen signifikanten Unterschied (p=0,133).



Mittelwerte unmittelbar nach Schädigung

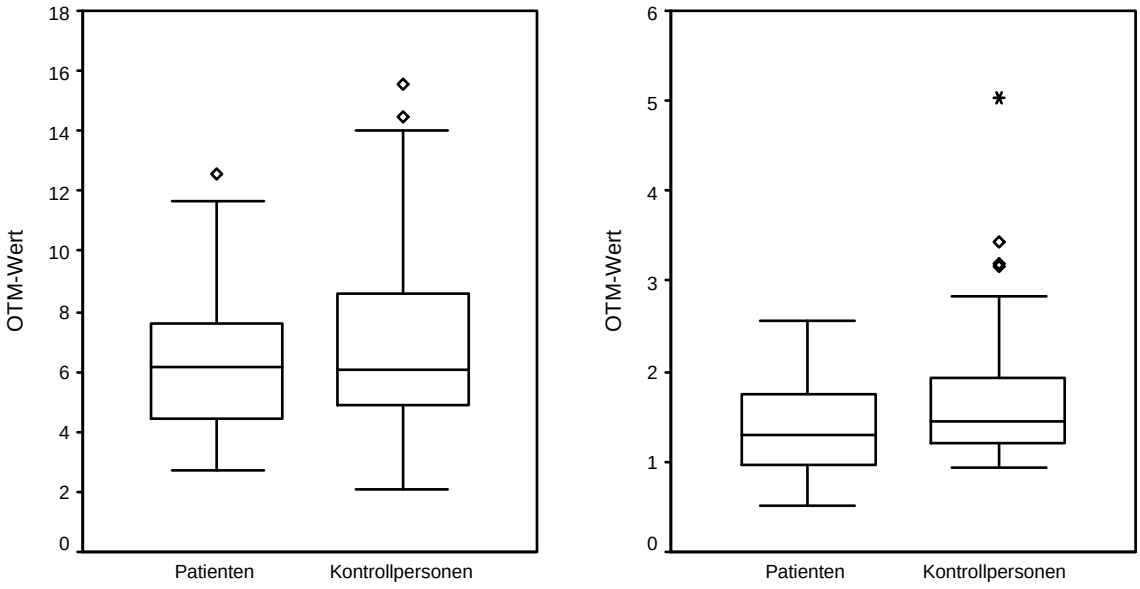
Mediane unmittelbar nach Schädigung

Graphiken 20, 21: Boxplotdarstellung der OTM-Mittelwerte und Mediane unmittelbar nach Schädigung durch NDEA, getrennt nach Patienten und Kontrollpersonen

d. Vergleich der DNS-Migrationen nach 15 Minuten Reparaturdauer

Nach einem 15-minütigen Reparaturintervall zeigten die Patientenlymphozyten einen OTM-Mittelwert von 6,48, die Kontrollgruppe einen Wert von 7,09. Signifikant war dieser Unterschied nicht (p=0,525).

Der Medianwert der Kontrollgruppe lag nach 15 Minuten Reparaturzeit mit 1,72 signifikant höher (p=0,039) als derjenige der Nierentransplantierten mit 1,38.



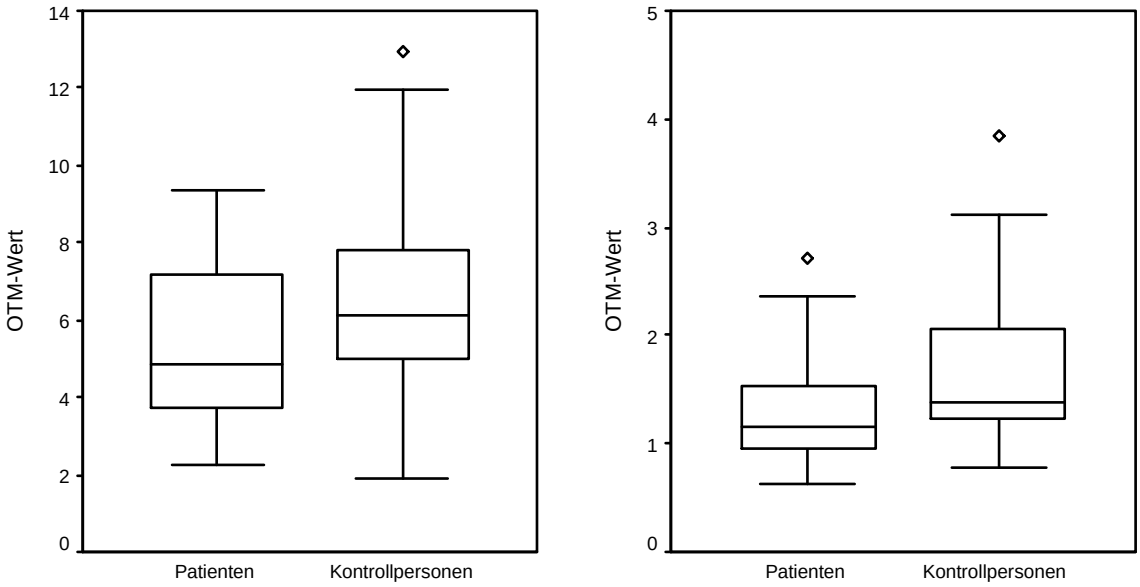
Mittelwerte nach 15 Minuten Reparatur

Mediane nach 15 Minuten Reparatur

Graphiken 22, 23: Boxplotdarstellung der OTM-Mittelwerte und Mediane nach 15 Minuten Reparatur, getrennt nach Patienten und Kontrollpersonen

e. Vergleich der DNS-Migrationen nach 30 Minuten Reparaturdauer

Die Mittelwerte der DNS-Migrationen der Kontrollgruppe lagen nach 30 Minuten Reparaturzeit bei 6,54, die der Patienten bei 5,45. Die Analyse mit dem Mann-Whitney U-Test ergab kein signifikantes Ergebnis (p=0,081).
Nach der Reparaturzeit von 30 Minuten lag der Median der DNS-Migrationen der Kontrollpatienten mit 1,67 signifikant höher (p=0,007) als derjenige der Patienten mit 1,28.



Mittelwerte nach 30 Minuten Reparatur

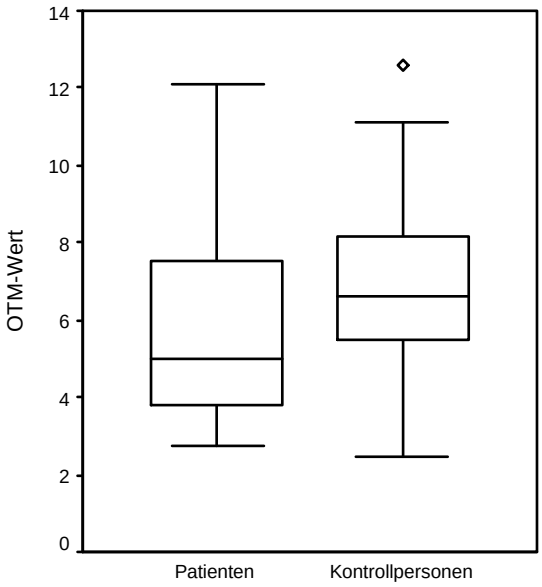
Mediane nach 30 Minuten Reparatur

Graphiken 24, 25: Boxplotdarstellung der OTM-Mittelwerte und Mediane nach 30 Minuten Reparatur, getrennt nach Patienten und Kontrollpersonen

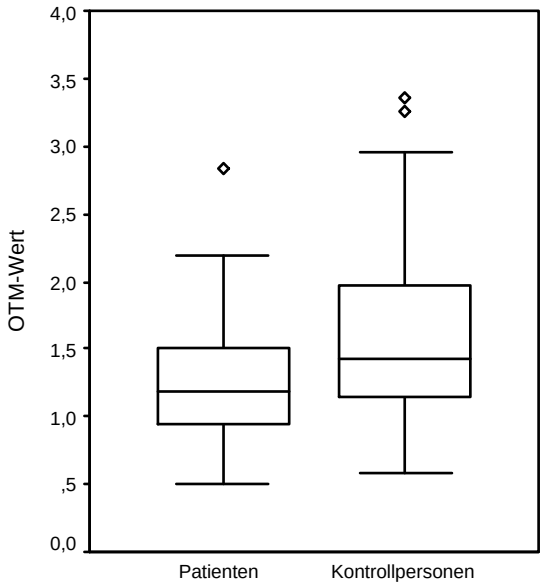
f. Vergleich der DNS-Migrationen nach 60 Minuten Reparaturdauer

Nach 60-minütigem Reparaturintervall zeigte die Lymphozyten-DNS der Kontrollgruppe einen mittleren OTM-Wert von 6,89. Der Mittelwert der Patienten lag bei 5,60. Dieser Unterschied war signifikant (p=0,008)

Auch beim Vergleich der Mediane nach 60 Minuten ergab sich für die Kontrollgruppe mit einem Median von 1,61 ein signifikant höherer Wert (p=0,009) als für die Patientengruppe mit einem Median von 1,26.



Mittelwerte nach 60 Minuten Reparatur



◊ Ausreißer; ∗ Extremwerte

Mediane nach 60 Minuten Reparatur

Graphiken 26, 27: Boxplotdarstellung der OTM-Mittelwerte und Mediane nach 60 Minuten Reparatur, getrennt nach Patienten und Kontrollpersonen

Tabelle 5: Vergleich der OTM-Mittelwerte von Nierentransplantierten und Kontrollpersonen im Mann-Whitney U-Test

Mittelwert	vor Ink.	Kontrolle	0 min	15 min	30 min	60 min
Patienten	1,71	1,99	8,33	6,48	5,45	**5,60**
Kontrollpersonen	2,02	1,97	7,48	7,09	6,54	**6,89**
p-Wert	0,182	0,103	0,522	0,525	0,081	**0,008**

Tabelle 6: Vergleich der Mediane der OTM-Werte von Nierentransplantierten und Kontrollpersonen mit dem Mann-Whitney U-Test

Median	vor Ink.	Kontrolle	0 min	15 min	30 min	60 min
Patienten	**0,85**	**1,09**	2,73	**1,38**	**1,28**	**1,26**
Kontrollpersonen	**1,72**	**1,46**	2,84	**1,72**	**1,67**	**1,61**
p-Wert	**0,005**	**<0,001**	0,133	**0,039**	**0,007**	**0,009**

Ein signifikanter Unterschied beim Vergleich der OTM-Mittelwerte ergab sich nur nach 60-minütigem Reparaturintervall, nach dem die Kontrollpersonen höhere durchschnittliche OTM-Werte zeigten als die Gruppe der nierentransplantierten Patienten. Dabei war der mittlere OTM-Wert der Nierentransplantierten unmittelbar nach Zugabe von NDEA zwar höher als derjenige bei den Kontrollpersonen, doch war dieser Unterschied nicht signifikant. Bereits nach 15 Minuten zeigte die Kontrollgruppe höhere mittlere OTM-Werte als die Gruppe der nierentransplantierten Patienten. Dieser Effekt verstärkte sich im weiteren Versuchsablauf immer mehr.

Beim Vergleich der Mediane zeigten die OTM-Werte von Patienten und Kontrollpersonen nur unmittelbar nach Zusatz von NDEA als schädigendes Agens keinen signifikanten Unterschied der OTM-Werte. Zu allen anderen Zeitpunkten der Lymphozytenreparatur, wie auch vor Inkubation, lagen die Mediane der Kontrollpersonen signifikant über den Medianen der Nierentransplantierten.

3.2.5 Vergleich der Mittelwerte und Mediane der DNS-Migrationen von männlichen nierentransplantierten Patienten und Kontrollpersonen

Ein Vergleich der OTM-Mittelwerte und der Mediane der Lymphozytenreparaturversuche von männlichen Patienten und Kontrollpersonen erfolgte mit dem Mann-Whitney U-Test für zwei unabhängige Stichproben.
Beim Vergleich der OTM-Mittelwerte ergab sich bei keinem Versuchsabschnitt ein signifikanter Unterschied (s. Tabelle 7).

Tabelle 7: Vergleich der OTM-Mittelwerte von nierentransplantierten Männern und männlichen Kontrollpersonen mit dem Mann-Whitney U-Test

Mittelwert	vor Ink.	Kontrolle	0 min	15 min	30 min	60 min
männl. Pat.	1,9	2,2	8,55	5,77	5,04	6,03
männl. Ko.	1,84	1,93	7,53	7,64	6,25	6,95
p-Wert	0,734	0,606	0,753	0,080	0,242	0,170

Der Vergleich der Mediane der OTM-Werte von männlichen Nierentransplantierten und Kontrollpersonen ergab einen signifikant höheren Medianwert der männlichen Kontrollpersonen vor Inkubation (p=0,023). Signifikant höhere Medianwerte (p=0,027) der männlichen Kontrollpersonen ließen sich auch bei der Kontrolle mit Aqua bidest. (p=0,027), nach 15- (p=0,021), 30- (p=0,010), sowie nach 60-minütigem Reparaturintervall (p=0,005) beobachten.
Unmittelbar nach Schädigung durch NDEA konnte dagegen kein signifikanter Unterschied zwischen dem Medianwert der DNS-Migrationen von männlichen Patienten und Kontrollpersonen nachgewiesen werden (s.Tabelle 8) .

Tabelle 8: Vergleich der Mediane der OTM-Werte von nierentransplantierten Männern und männlichen Kontrollpersonen mit dem Mann-Whitney U-Test

Median	vor Ink.	Kontrolle	0 min	15 min	30 min	60 min
männl. Pat.	**0,82**	**1,13**	2,98	**1,34**	**1,15**	**1,15**
männl. Ko.	**1,74**	**1,49**	2,87	**1,80**	**1,79**	**1,72**
p-Wert	**0,023**	**0,027**	0,406	**0,021**	**0,010**	**0,005**

3.2.6 Vergleich der Mittelwerte und der Mediane der DNS-Migrationen von weiblichen Nierentransplantierten und Kontrollpersonen

Beim Vergleich der OTM-Mittelwerte von weiblichen Nierentransplantierten und Kontrollpersonen ergab sich lediglich nach 60-minütiger Reparaturzeit ein signifikanter Unterschied (p=0,020). Hier wiesen die weiblichen Kontrollpersonen einen signifikant höheren Fragmentierungsgrad der Lymphozyten-DNS auf als die weiblichen Nierentransplantierten (s. Tabelle 9).

Tabelle 9: Vergleich der OTM-Mittelwerte von nierentransplantierten Frauen und weiblichen Kontrollpersonen mit dem Mann-Whitney U-Test

Mittelwert	vor Ink.	Kontrolle	0 min	15 min	30 min	60 min
weibl. Pat.	1,5	1,77	8,10	7,27	5,89	**5,12**
weibl. Ko.	2,19	2,02	7,43	6,49	6,85	**6,82**
p-Wert	0,056	0,070	0,672	0,274	0,335	**0,020**

Der Vergleich der Mediane von weiblichen Patienten und Kontrollpersonen vor Inkubation der Lymphozyten ergab keinen signifikanten Unterschied. Ebenso verhielt es sich beim Vergleich der Mediane unmittelbar nach Schädigung durch NDEA, sowie nach 15, 30 und 60 Minuten Reparaturdauer.
Bei der Kontrolle mit Aqua bidest. zeigten die weiblichen Patienten niedrigere Medianwerte als die weiblichen Kontrollpersonen (s. Tabelle 10). Dieser Unterschied stellte sich im Mann-Whitney U-Test signifikant dar (p=0,004).

Tabelle 10: Vergleich der Mediane der OTM-Werte von nierentransplantierten Frauen und weiblichen Kontrollpersonen mit dem Mann-Whitney U-Test

Median	vor Ink.	Kontrolle	0 min	15 min	30 min	60 min
weibl. Pat.	0,89	**1,06**	2,45	1,42	1,42	1,37
weibl. Ko.	1,69	**1,44**	2,79	1,64	1,55	1,48
p-Wert	0,132	**0,004**	0,184	0,502	0,300	0,439

3.2.7 Vergleich der Mittelwerte und Mediane der DNS-Migrationen von männlichen und weiblichen nierentransplantierten Patienten

Um eventuell bestehende Geschlechtsunterschiede in der Reparaturkapazität der Lymphozyten des nierentransplantierten Patientenstammes nachzuweisen, wurden die OTM-Mittelwerte und die Mediane der männlichen und weiblichen Patienten für jeden Versuchsabschnitt mit dem Mann-Whitney U-Test für zwei unverbundene Stichproben verglichen.
Bei der durchgeführten Analyse der OTM-Mittelwerte ergab sich jedoch für keinen Versuchsabschnitt ein signifikanter Unterschied zwischen nierentransplantierten Männern und Frauen (s. Tabelle 11).

Tabelle 11: Vergleich der OTM-Mittelwerte von männlichen und weiblichen Nierentransplantierten mit dem Mann-Whitney U-Test

Mittelwert	vor Ink.	Kontrolle	0 min	15 min	30 min	60 min
männlich	1,90	2,20	8,55	5,77	5,04	6,03
weiblich	1,50	1,77	8,10	7,27	5,89	5,12
p-Wert	0,342	0,597	0,935	0,050	0,126	0,440

Der Vergleich der Mediane der DNS-Schädigung von männlichen und weiblichen nierentransplantierten Patienten mit dem Mann-Whitney U-Test für zwei unabhängige Stichproben ergab ebenfalls für keinen der Versuchsschritte einen signifikanten Unterschied (s. Tabelle 12).

Tabelle 12: Vergleich der Mediane der OTM-Werte von männlichen und weiblichen Nierentransplantierten mit dem Mann-Whitney U-Test

Median	vor Ink.	Kontrolle	0 min	15 min	30 min	60 min
männlich	0,82	1,13	2,98	1,34	1,15	1,15
weiblich	0,89	1,06	2,45	1,42	1,42	1,37
p-Wert	0,629	0,755	0,551	0,551	0,155	0,250

Bei keinem der Versuchabschnitte der Lymphozytenreparatur konnte beim Vergleich von männlichen und weiblichen Nierentransplantierten ein signifikanter Unterschied gefunden werden. Eine Abhängigkeit der Lymphozytenreparatur von der Geschlechtszugehörigkeit konnte in der Gruppe der Nierentransplantierten nicht erbracht werden.

3.2.8 Vergleich der Mittelwerte und Mediane der DNS-Migrationen von männlichen und weiblichen Kontrollpersonen

Zum Vergleich der Mittelwerte und Mediane der DNS-Migrationen von männlichen und weiblichen Kontrollpersonen wurde ebenfalls der Mann-Whitney U-Test herangezogen.
Beim Vergleich der Mittelwerte ergab sich bei keinem Versuchsschritt ein signifikanter Unterschied (s. Tabelle 13).

Tabelle 13: Vergleich der OTM-Mittelwerte von männlichen und weiblichen Kontrollpersonen mit dem Mann-Whitney U-Test

Mittelwert	vor Ink.	Kontrolle	0 min	15 min	30 min	60 min
männlich	1,84	1,93	7,53	7,64	6,25	6,95
weiblich	2,19	2,02	7,43	6,49	6,85	6,82
p-Wert	0,655	0,440	0,903	0,198	0,516	0,685

Auch die vergleichende Analyse der Mediane von männlichen und weiblichen Kontrollpersonen ergab keinen signifikanten Effekt (s. Tabelle 14).

Tabelle 14: Vergleich der Mediane der OTM-Werte von männlichen und weiblichen Kontrollpersonen mit dem Mann-Whitney U-Test

Median	vor Ink.	Kontrolle	0 min	15 min	30 min	60 min
männlich	1,74	1,49	2,87	1,80	1,79	1,72
weiblich	1,69	1,44	2,79	1,64	1,55	1,48
p-Wert	0,881	0,978	0,695	0,635	0,850	0,261

Bei keinem Versuchsabschnitt der Lymphozytenreparaturversuche ließen sich beim Vergleich der OTM-Mittelwerte und der Mediane von männlichen und weiblichen Kontrollpersonen signifikante Unterschiede nachweisen. Der Nachweis einer Geschlechtsgebundenheit der Versuchsergebnisse konnte für das Kontrollkollektiv nicht erbracht werden.

3.2.9 Varianzanalyse des Verlaufs der Lymphozytenreparatur anhand der Mittelwerte und Überprüfung der Einflussnahme der Zellvitalitäten auf die DNS-Migration

Die Varianzanalyse des Verlaufs der Lymphozytenreparatur erfolgte unter Anwendung des allgemeinen linearen Modells für Messwiederholungen. Dabei wurde der Reparaturverlauf durch die fünf Versuchsschritte: Kontrolle, 0 Minuten Reparaturzeit, 15-, 30- und 60-minütiges Reparaturintervall definiert, für Patienten und Kontrollgruppe getrennt analysiert und miteinander verglichen.

a. Test der Innersubjektkontraste

Der Test der Innersubjektkontraste diente zur Erfassung von Unterschieden im Kurvenverlauf der Reparaturverläufe von Patienten und Kontrollpersonen.
Für die Reparaturverläufe in Abhängigkeit von der Zugehörigkeit zum Patienten- oder Kontrollkollektiv ergaben sich signifikante Unterschiede für die lineare (lineare Geraden) (p=0,000) und die kubische (Doppelwellen) (p=0,029), nicht aber für die quadratische (U-Wellen) Verlaufsprüfung (p=0,514) und auch nicht für die Verlaufsprüfung vierter Ordnung (dreifache Wellen) (p=0,210).

b. Mulitvariate Tests - Test der Zwischensubjekteffekte mittels t-Test

Bei den Tests der Zwischensubjekteffekte, sprich der Unterschiede zwischen Werten der Patienten- und der Kontrollgruppe zu den einzelnen Versuchszeitpunkten, mit dem t-Test für unverbundene Stichproben ergab sich ein signifikanter Unterschied beim Vergleich der Mittelwerte nach 30 (p=0,041) Minuten Reparaturdauer. Ebenfalls signifikant war der Unterschied zwischen den Werten von Patienten- und Kontrollkollektiv beim Vergleich der Werte nach 60-minütigem Reparaturintervall (p=0,014). Beide Male lagen die mittleren OTM-Werte der Kontrollgruppenpatienten somit signifikant höher.

c. Einfluss der Zellvitalitäten auf die DNS-Migration

Um den Einfluss der Zellvitalitäten auf das Migrationsverhalten der Lymphozyten-DNS von Patienten und Kontrollpersonen zu prüfen, fand das allgemeine lineare Modell für Messwiederholungen mit den Zellvitalitäten als Kovariate Anwendung. So war es möglich, die Reparaturverläufe zu betrachten und zugleich den Einfluss eventuell höherer Anteile von avitalen Zellen auf die OTM-Werte im Ergebnis zu berücksichtigen. Bei der Analyse der Unterschiede im Reparaturverlauf von Patienten- und Kontrollgruppe mit den Zellvitalitäten als Kovariaten ergaben sich jedoch in den Tests der Innersubjektkontraste Ergebnisse, die sich kaum von den unter 3.2.9.a und b. genannten unterschieden. Es ergab sich Signifikanz für die lineare

(Geraden) Verlaufsanalyse (p=0,005) wie auch für die kubische (Doppelwellen) (p=0,034). Keine Signifikanz ergab sich wiederum für die quadratische (U-Kurven) (p=0,910) und für die Verlaufsdarstellung vierter Ordnung (dreifache Wellen) (p=0,304). Somit lässt sich feststellen, dass eine Einflussnahme der Lymphozytenvitalitäten auf die Reparaturverläufe von Patienten und Kontrollpersonen nicht angenommen werden kann.

3.2.10 Varianzanalyse des Verlaufs der Lymphozytenreparatur anhand der Mediane und Überprüfung der Einflussnahme der Zellvitalitäten der Lymphozyten auf die DNS-Migration

Ebenso wie für die Mittelwerte wurde auch für die Mediane der Lymphozytenreparaturversuche eine Varianzanalyse über das allgemeine lineare Modell für Messwiederholungen durchgeführt. Dabei wurden die Reparaturverläufe durch die Medianwerte der DNS-Schädigung, dargestellt als OTM-Werte, zu den Zeitpunkten Kontrolle mit Aqua bidest sowie für 0, 15, 30 und 60 Minuten Reparaturzeit definiert und für Patienten- und Kontrollkollektiv getrennt analysiert.

a. Tests der Innersubjektkontraste

Die Reparaturverläufe in Abhängigkeit von der Zugehörigkeit zum Patienten- und Kontrollkollektiv, die in den Tests der Innersubjektkontraste analysiert wurden, zeigten keine signifikanten Unterschiede. Weder für das lineare (p=0,567) noch für das quadratische (p=0,576), kubische (p=0,376) oder das Verlaufsmodell vierter Ordnung (p=0,583) wurde Signifikanz erreicht.

b. Multivariate Tests - Test der Zwischensubjekteffekte mittels t-Test

Der t-Test für unverbundene Stichproben zur Prüfung der Zwischensubjekteffekte, sprich zur Analyse der Werteunterschiede zu den einzelnen Versuchszeitpunkten, wurde - wie schon bei der Mittelwertsanalyse - auch hier durchgeführt. Dabei ergaben sich für die Kontrollpatienten sowohl für die Kontrolle mit Aqua bidest (p=0,000) wie auch nach 15 (p=0,028), 30 (p=0,006) und 60 Minuten (p=0,008) Reparaturzeit signifikant höhere Mediane der OTM-Werte als für die nierentransplantierten Patienten.

c. Einfluss der Zellvitalitäten auf die DNS-Migration

Um eine mögliche Auswirkung der Lymphozytenvitalitäten auf den Verlauf der DNS-Reparaturen von Patienten und Kontrollgruppe nicht zu übersehen, wurde auch für die Medianwerte die Varianzanalyse über das allgemeine lineare Modell für Messwiederholungen mit

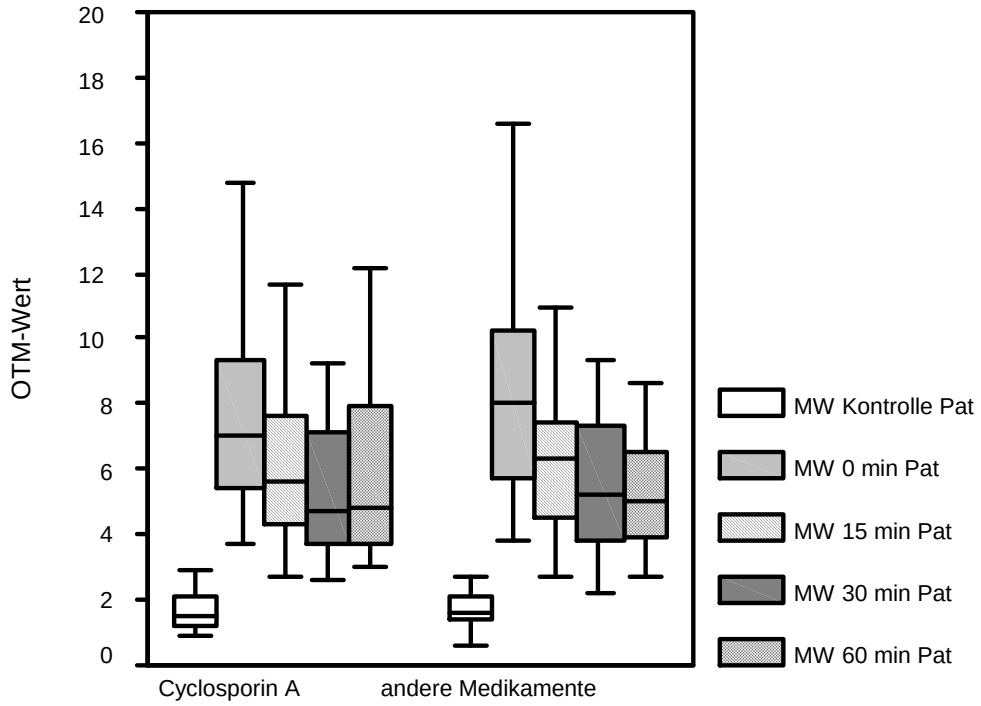
den Vitalitätsangaben als Kovariaten durchgeführt. Auch hier konnte ein Einfluss der Vitalitätswerte auf die Verlaufskurven der Lymphozytenreparatur über Zeit von Patienten und Kontrollpersonen nicht beobachtet werden. Weder für die lineare (p=0,687) noch für die quadratische (p=0,997), kubische (p=0,541) oder die Verlaufsprüfung vierter Ordnung (p=0,520) ergab sich Signifikanz. Ein signifikanter Einfluss der Zellvitalitäten auf die anhand der Medianwerte dargestellten Reparaturverläufe lässt sich somit ausschließen.

3.2.11 Überprüfung der Einflussnahme von Cyclosporin A auf die DNS-Migration

18 der 40 nierentransplantierten Patienten in dieser Studie erhielten Cyclosporin A in Kombination mit anderen Immunsuppressiva wie Mycophenolat Mofetil, Azathioprin und Methylprednison. Bei Patienten, die eine immunsuppressive Kombinationstherapie mit Cyclosporin A erhalten, wird von einer erhöhten Malignominzidenz ausgegangen. Darüberhinaus steht Cyclosporin A im Verdacht, die DNS-Reparatur nachhaltig zu beeinflussen. Deshalb wurde eine mögliche Einflussnahme von Cyclosporin A auf die DNS-Reparatur in dieser Studie überprüft, indem das DNS-Migrationsverhalten der mit Cyclosporin A behandelten Patienten mit dem der Patienten ohne Cyclosporin A im Medikationsschema verglichen wurde. Als Test fand der Mann-Whitney U-Test für zwei unverbundene Stichproben Anwendung.

a. Vergleich der Mittelwerte der DNS-Migrationen innerhalb der Patientengruppe in Abhängigkeit von der Cyclosporin A-Therapie

Für jeden der Versuchsschritte Kontrolle mit Aqua bidest., 0, 15, 30 und 60 Minuten Reparaturzeit sowie vor Inkubation mit NDEA wurden die OTM-Mittelwerte der Lymphozytenreparatur für die Patientengruppen mit und ohne Cyclosporin A im Medikationsschema mit dem Mann-Whitney U-Test verglichen (s. Tabelle 15). Dabei ergab sich bei keinem der Versuchsabschnitte ein signifikantes Ergebnis.



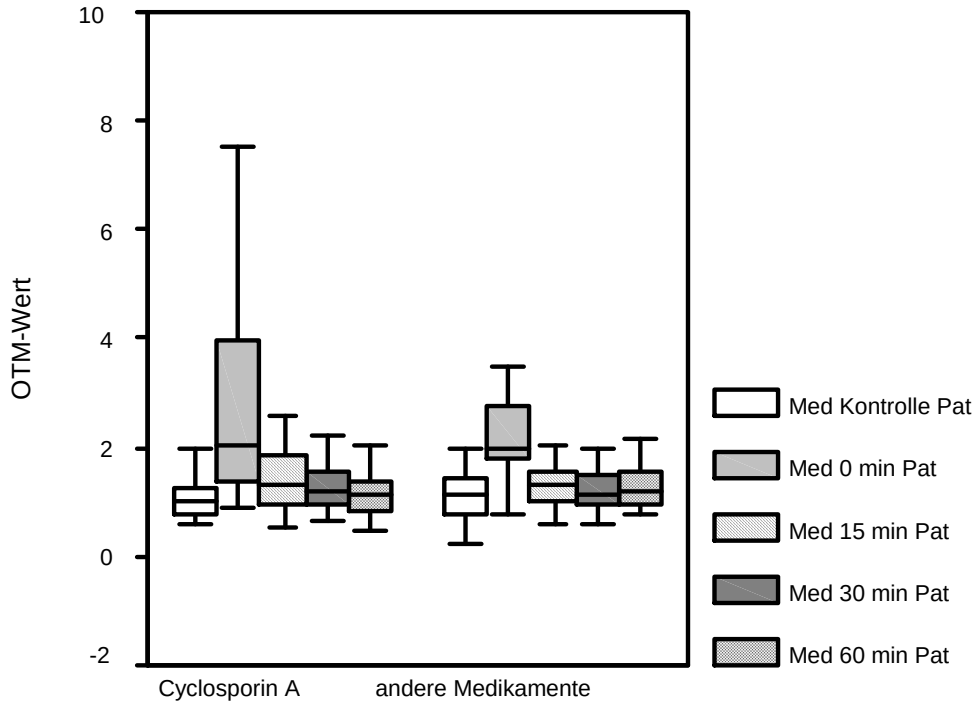
Graphik 28: Vergleich der OTM-Mittelwerte in Abhängigkeit von der Immunsuppression mit Cyclosporin A

Tabelle 15: Vergleich der OTM-Mittelwerte innerhalb der Patientengruppe nach Medikation mit und ohne Cyclosporin A mit dem Mann-Whitney U-Test

Mittelwert	vor Ink.	Kontrolle	0 Minuten	15 Minuten	30 Minuten	60 Minuten
mit Cyc.A	1,67	2,01	7,90	6,20	5,26	5,93
ohne Cyc.A	1,75	1,93	9,02	6,88	5,77	5,48
p-Wert	0,580	0,693	0,447	0,395	0,485	0,927

b. Vergleich der Mediane der DNS-Migrationen innerhalb der Patientengruppe in Abhängigkeit von der Cyclosporin A-Therapie

Auch die Mediane der DNS-Migrationen der nierentransplantierten Patienten mit und ohne Cyclosporin A als Bestandteil der immunsuppressiven Basismedikation wurden mit dem Mann-Whitney-U Test für jeden Versuchsschritt verglichen (s. Tabelle 16). Ein signifikanter Unterschied ergab sich auch hier nicht.



Graphik 29: Vergleich der Mediane der OTM-Werte in Abhängigkeit von der Immunsuppression mit Cyclosporin A

Tabelle 16: Vergleich der Mediane der OTM-Werte innerhalb der Patientengruppe nach Medikation mit und ohne Cyclosporin A mit dem Mann-Whitney U-Test

Median	vor Ink.	Kontrolle	0 Minuten	15 Minuten	30 Minuten	60 Minuten
mit Cyc. A	0,78	1,08	3,03	1,42	1,24	1,18
ohne Cyc.A	0,90	1,06	2,52	1,30	1,25	1,28
p-Wert	0,184	0,761	0,843	0,820	0,964	0,513

3.3 Vergleich der Bildung von Mikrokernen bei nierentransplantierten Patienten und Kontrollpersonen

3.3.1 Überblick über die Ergebnisse des Mikrokerntests

Einen Überblick über die Ergebnisse des Mikrokerntests bei allen Studienteilnehmern, bei den nierentransplantierten Patienten und bei den Kontrollpersonen, sowie nach weitere Aufteilung nach Geschlechtszugehörigkeit, sollen die Tabellen 17 und 18 liefern.

Tabelle 17: Mittelwerte und Mediane der Mikrokerntestergebnisse

Mikrokerne (‰)	Mittelwert	Median
Insgesamt	8,35	6,00
Männer	6,24	5,00
Frauen	10,68	8,50
Patienten	8,38	6,00
Kontrollpersonen	8,32	6,50
Patienten männlich	6,00	5,00
Patienten weiblich	11,00	12,00
Kontrollgruppe männlich	6,48	5,00
Kontrollgruppe weiblich	10,37	8,00

Die niedrigsten und höchsten Mikrokernfrequenzen, die bei allen Studienteilnehmern, nach Aufteilung nach Zugehörigkeit zum Patienten- und Kontrollkollektiv, sowie nach Trennung nach Geschlechtern beobachtet wurden, sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle18: Mikrokerntest – niedrigste und höchste Einzelwerte

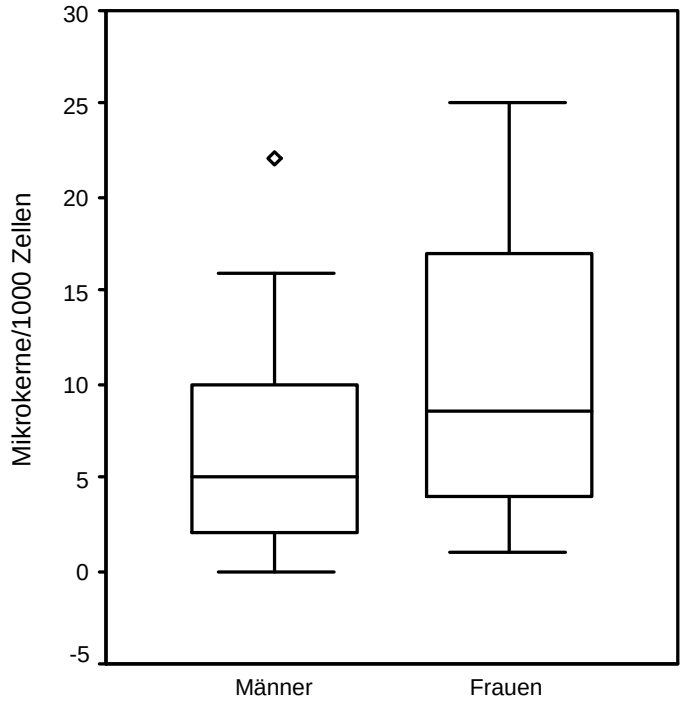
Mirkokerne (‰)	niedrigste Einzelwerte	höchste Einzelwerte
Insgesamt	0	25
Männer	0	22
Frauen	1	25
Patienten	0	25
Kontrollgruppe	0	23
Patienten männlich	0	22
Patienten weiblich	1	25
Kontrollgruppe männlich	0	16
Kontrollgruppe weiblich	1	23

3.3.2 Kolmogorov-Smirnov-Test mit Korrektur nach Lilliefors zur Prüfung der Normalverteilung

Der Kolmogorov-Smirnov-Test mit Korrektur nach Lilliefors ergab sowohl für die Mikrokerntestergebnisse des Patienten- wie auch für die des Kontrollkollektivs signifikante Ergebnisse (Patienten: p=0,009; Kontrollgruppe: p=0,001). Somit musste die Annahme einer Normalverteilung der Testergebnisse abgelehnt werden. Die weitere Analyse der Ergebnisse erfolgte mittels nicht-parametrischer Tests.

3.3.3 Mikrokernfrequenz in Abhängigkeit vom Geschlecht

Während alle männlichen Versuchsteilnehmer, egal ob Patient oder Kontrollperson, einen mittleren Wert von 6,24 ‰ Mikrokernen aufwiesen, zeigten alle weiblichen Versuchsteilnehmer mit durchschnittlich 10,68 ‰ Mikrokernen deutlich höhere Ergebnisse. Dieser Unterschied stellte sich im Mann-Whitney U-Test mit einem p-Wert von 0,004 signifikant dar.



Graphik 30: Boxplotdarstellung der Ergebnisse des Mikrokerntests, getrennt nach Geschlecht

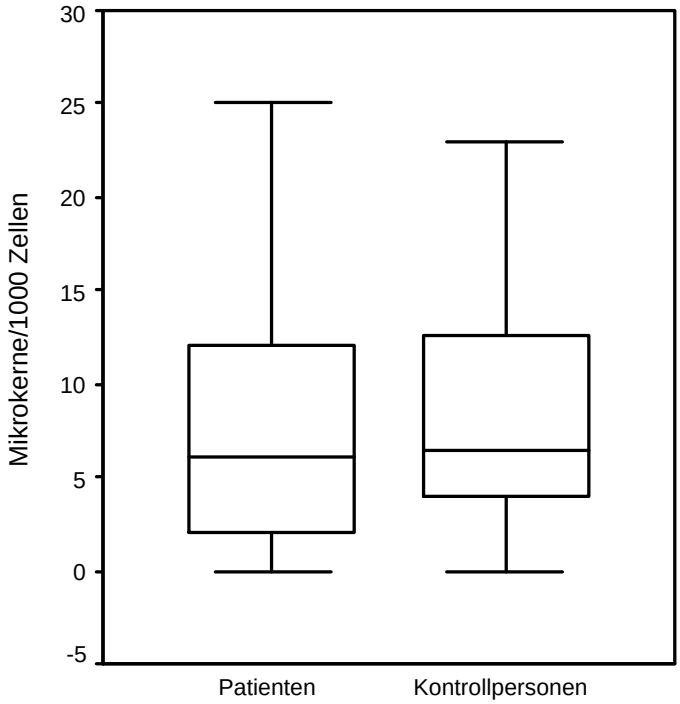
Dies bestätigte auch die Korrelationsanalyse von Mikrokernhäufigkeit und Geschlechtszugehörigkeit. Hier zeigte sich, dass Mikrokernfrequenz mit dem Geschlecht korreliert. So zeigten alle Männer in dieser Studie, egal ob Patient oder Kontrollperson, signifikant niedrigere Werte als Frauen. Die Analyse ergab einen Korrelationskoeffizienten nach Pearson von r=0,349, der auf eine geringe Korrelation hinweist und bei einer zweiseitigen Testung mit einem p-Wert von p=0,001 hochsignifikant war.

3.3.4 Korrelation von Mikrokernfrequenz und Alter

Eine Korrelationsanalyse von Mikrokernhäufigkeiten und Alter aller 80 Studienteilnehmer wurde durchgeführt. Dabei ergab die Korrelationsanalyse von Alter und Mikrokerntestergebnissen mit einem Korrelationskoeffizienten nach Pearson von r=0,150 und einer zweiseitigen Signifikanz von p=0,183 keinen Zusammenhang zwischen der Höhe der Ergebnisse des Mikrokerntests und dem Alter der Patienten.

3.3.5 Vergleich der Mikrokernfrequenzen von Patienten und Kontrollpersonen

Der Vergleich der Testergebnisse von Patienten und Kontrollpatienten erfolgte mit dem Mann-Whitney U-Test für zwei unverbundene Stichproben. Ein signifikanter Unterschied der Mittelwerte für Patienten (8,38 ‰) und Kontrollpatienten (8,32 ‰) ergab sich mit einem p-Wert von 0,699 nicht.



Graphik 31: Boxplotdarstellung der Mikrokerntestergebnisse von Nierentransplantierten und Kontrollpersonen

Ein signifikanter Unterschied in der Mikrokernfrequenz zwischen Nierentransplantierten und Kontrollpersonen ließ sich somit nicht nachweisen.

3.3.6 Vergleich der Mikrokernfrequenzen von männlichen Nierentransplantierten und Kontrollpersonen

Die Testergebnisse der männlichen Kontrollgruppe lagen mit durchschnittlich 6,48 ‰ Mikrokernen pro tausend Zellen kaum höher als die der männlichen Patientengruppe mit 6,00 ‰ Mikrokernen. Der mittels Mann-Whitney U-Test analysierte Unterschied war nicht signifikant (p= 0,561).

3.3.7 Vergleich der Mikrokernfrequenzen von weiblichen Nierentransplantierten und weiblichen Kontrollpersonen

Die nierentransplantierten Patientinnen hatten im Mittel 11,0 ‰ Mikrokerne, während die Kontrollpersonen 10,37 ‰ Mikronkerne aufwiesen. Auch hier ergab der Mann-Whitney-Test keinen signifikanten Unterschied (p=0,942).

Somit lässt sich zusammenfassend feststellen, dass auch nach Aufteilung des Patienten- und Kontrollkollektivs nach Geschlecht und nach gesondertem Vergleich gleichgeschlechtlicher Patienten und Kontrollpersonen keine signifikant erhöhte Mikrokernfrequenz bei Nierentransplantierten nachweisbar war.

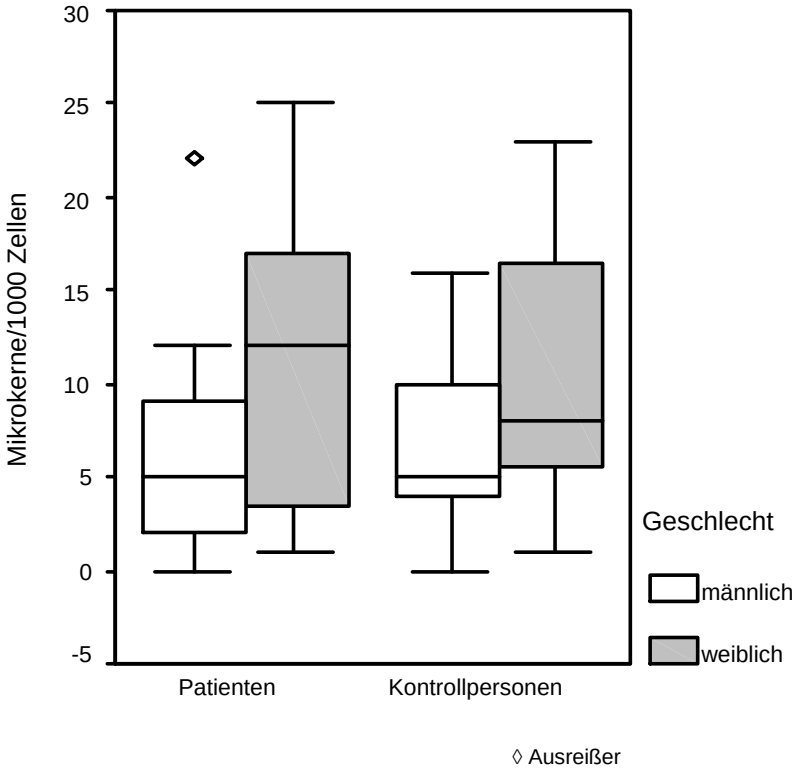
3.3.8 Vergleich der Mikrokernfrequenzen von männlichen und weiblichen nierentransplantierten Patienten

Beim Vergleich der Mikrokernhäufigkeiten der 21 männlichen und 19 weiblichen Patienten zeigten die weiblichen Nierentransplantierten signifikant (p=0,035) höhere Werte.

3.3.9 Vergleich der Mikrokernfrequenzen von männlichen und weiblichen Kontrollpersonen

Auch innerhalb der Kontrollgruppe zeigten die Frauen signifikant höhere Ergebnisse (p=0,041) als die Männer.

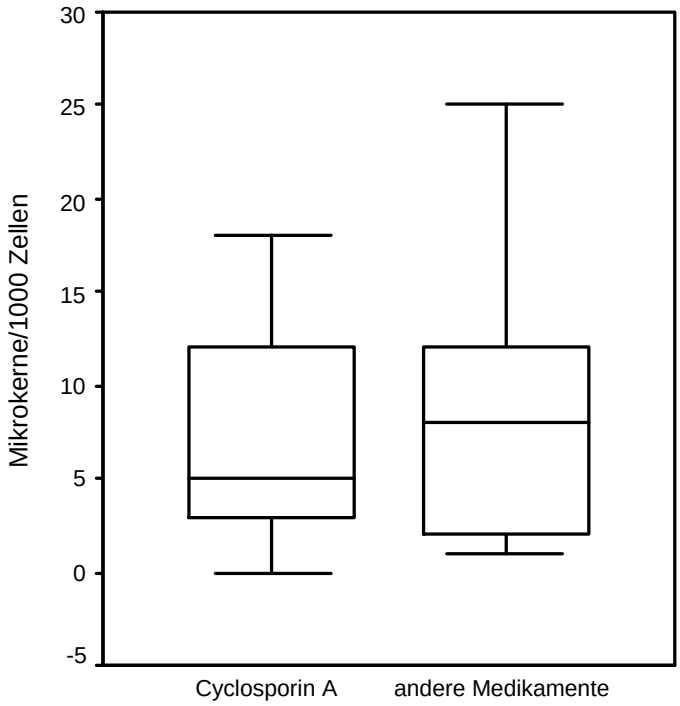
Sowohl für die Gruppe der Nierentransplantierten als auch für die Kontrollgruppe traf zu, was bereits beim Vergleich von Männern und Frauen allgemein feststellbar war: eine signifikant erhöhte Mikrokernhäufigkeit bei den Frauen im Vergleich mit den Männern.



Graphik 32: Ergebnisse des Mikrokerntests von Nierentransplantierten und Kontrollpersonen, getrennt nach Geschlecht

3.3.10 Überprüfung des Einflusses von Cyclosporin A auf die Mikrokernbildung

Das Immunsuppressivum Cyclosporin A war bei 18 der 40 nierentransplantierten Patienten Teil des Medikationsschemas. Dieser Substanz wird in der Literatur eine nicht unbedeutende Rolle bei der Entstehung maligner Neoplasien zugeschrieben. Um einen möglichen Effekt von Cyclosporin A auf die Entstehungshäufigkeit von Mikrokernen zu erfassen, wurde die Mikrokernhäufigkeit in Lymphozyten derjenigen Patienten, in deren Medikationsschema Cyclosporin A neben anderen Medikamenten enthalten war, mit der Mikrokernanzahl bei den nierentransplantierten Patienten, die andere Medikamentenkombinationen beispielweise mit Tacrolimus oder Mycophenolat Mofetil erhielten, verglichen. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Mann-Whitney U-Test für zwei unabhängige Stichproben. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Mikrokernhäufigkeiten beider Patientengruppen ergab sich jedoch nicht.



Graphik 33: Boxplotdarstellung der Mikrokernfrequenzen bei Immunsupprimierten mit und ohne Cyclosporin A

Tabelle19: Vergleich der Mikrokernfrequenzen von Patienten mit und ohne Cyclosporin A im Medikationsschema

Mikrokerne (‰)	Mittelwert (‰)
mit Cyclosprin A	7,00
ohne Cyclosporin A	9,47
p-Wert	0,368

3.4 Korrelation der DNS-Migration und der Mikrokernbildung

Mit den Lymphozyten eines jeden Studienteilnehmers, egal ob zum Patienten- oder Kontrollkollektiv gehörend, wurde sowohl ein Lymphozytenreparaturversuch als auch ein Mikrokerntest durchgeführt. Dies geschah nicht zuletzt, um einen möglicherweise bestehenden Zusammenhang zwischen dem Migrationsverhalten der Lymphozyten-DNS und der Anzahl von

Mikrokernfrequenz aufzudecken. Zur Prüfung eventueller Zusammenhänge wurde eine bivariate Korrelationsanalyse durchgeführt. Hierbei wurde die Mikrokernfrequenz in unbehandelten Lymphozyten mit dem Migrationsverhalten unbehandelter Lymphozyten-DNS, wie sie im Kontrollansatz mit Aqua bidest. enthalten war, verglichen.
Die Korrelationsanalyse ergab einen Koeffizienten nach Pearson von 0,141 bei einer zweiseitigen Signifikanz von 0,212. Somit bestand hier nur eine sehr geringe Korrelation bei fehlender Signifikanz.

3.5 Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse

3.5.1 Mutagensensitivität und Reparaturkapazität bei Nierentransplantierten und Kontrollpersonen

a. Vergleich der Lymphozytenzahlen von Patienten- und Kontrollkollektiv

Beim Vergleich der Lymphozytenzahlen zu Versuchsbeginn ergab sich beim Vergleich von Patienten und Kontrollpersonen kein signifikanter Unterschied.

b. Vergleich der Lymphozytenvitalitäten von Patienten- und Kontrollkollektiv

Der Vergleich der Zellvitalitäten von Patienten und Kontrollpersonen ergab zu Versuchsbeginn für die Kontrollgruppe signifikant höhere Zellvitalitäten als für die Nierentransplantierten. Nach 60-minütigem Reparaturintervall hingegen zeigten die Patienten signifikant (p=0,035) höhere Vitalitätswerte als die Kontrollgruppe.
Beim Vergleich von Patienten und Kontrollpersonen nach Geschlechtsaufteilung ergab sich kein signifikanter Unterschied.

c. Vergleich der DNS-Migrationen von Patienten und Kontrollpersonen anhand von Mittelwerten und Medianen

Der Vergleich der Mittelwerte von Patienten und Kontrollpersonen ergab signifikant höhere Mittelwerte für die Kontrollgruppe nach 60 Minuten Reparaturdauer.
Der Vergleich der Mediane ergab signifikant höhere Mediane der Kontrollpersonen vor Inkubation, für die Kontrolle mit Aqua bidest., nach 15, 30 und 60 Minuten Reparaturdauer.
Unmittelbar nach Zusatz von NDEA zeigte sich kein Unterschied der Mittelwerte und kein Unterschied der Mediane von Patienten und Kontrollpersonen.

d. Vergleich der Mittelwerte und Mediane der DNS-Migrationen von männlichen Nierentransplantierten und Kontrollpersonen

Der Vergleich der DNS-Migrationen von männlichen Patienten und Kontrollpersonen ergab keinen Unterschied der Mittelwerte, die Mediane der männlichen Kontrollpersonen lagen bei allen Versuchsschritten außer 0 min Reparatur signifikant höher.

e. Vergleich der Mittelwerte und Mediane der DNS-Migrationen von weiblichen Nierentransplantierten und Kontrollpersonen

Der Vergleich der DNS-Migrationen von weiblichen Patienten und Kontrollpersonen erbrachte signifikant höhere Mittelwerte der Kontrollpersonen nach 60-minütigem Reparaturintervall. Signifikant höhere Mediane ergaben sich bei den weiblichen Kontrollpersonen für die Kontrolle mit Aqua bidest.

f. Vergleich der Mittelwerte und Mediane der DNS-Migrationen von männlichen und weiblichen nierentransplantierten Patienten, sowie von männlichen und weiblichen Kontrollpersonen

Beide Analysen zeigten keine signifikanten Unterschiede der Mittelwerte und Mediane der DNS-Migrationen in den jeweils verglichenen Gruppen bei allen untersuchten Reparaturintervallen.

g. Varianzanalyse des Verlaufs der Lymphozytenreparatur anhand der Mittelwerte und Mediane und Überprüfung der Einflussnahme der Zellvitalitäten auf die DNS-Migration

Der Vergleich der Mittelwerte mittels Varianzanalyse ergab signifikant höhere Werte der Kontrollpersonen nach 30 und 60 Minuten Reparatur.
Der Vergleich der Mediane der DNS-Migrationen zeigte signifikant höhere Werte der Kontrollpersonen für die Kontrolle mit Aqua bidest., 15, 30 und 60 Minuten Reparaturdauer. Keine signifikanten Unterschiede bestanden nach 0 Minuten Reparaturdauer.
Ein Einfluss der Zellvitalitäten auf Unterschiede der Mittelwerte und Mediane der DNS-Migrationen bei Patienten und Kontrollpersonen konnte nicht nachgewiesen werden.

h. Überprüfung der Einflussnahme von Cyclosporin A auf die DNS-Migration

Ein Einfluss von Cyclosporin A auf die DNS-Migrationen *innerhalb der Patientengruppe* konnte nicht beobachtet werden.

3.5.2 Vergleich der Bildung von Mikrokernen

a. Mikrokernfrequenz in Abhängigkeit vom Geschlecht

Die Analyse der Geschlechtsabhängigkeit der Mikrokernbildung ergab signifikant höhere Werte aller weiblichen Studienteilnehmer. Dies wurde durch die Korrelationsanalyse bestätigt.

b. Korrelation von Mikrokernfrequenz und Alter

Die Korrelationsanalyse von Mikrokerntest und Alter ergab keine Korrelation.

c. Vergleich der Mikrokernfrequenzen von Patienten und Kontrollpersonen

Der Vergleich der Mikrokernfrequenzen von Patienten und Kontrollpersonen ergab keinen signifikanten Unterschied. Ebenso fielen die Analysen der Unterschiede in den Mikrokernfrequenzen von männlichen Patienten und Kontrollpersonen, sowie von weiblichen Patienten und Kontrollpersonen nicht signifikant aus. Dagegen ergab der Vergleich von männlichen und weiblichen Patienten sowie von männlichen und weiblichen Kontrollpersonen signifikant höhere Mikrokernfrequenzen bei den Frauen.

d. Überprüfung des Einflusses von Cyclosporin A auf die Mikrokernbildung

Eine Abhängigkeit der Mikrokernhäufigkeiten von Cyclosporin A konnte innerhalb der Patientengruppe nicht nachgewiesen werden.

3.5.3 Korrelation der DNS-Migration und der Mikrokernbildung

Die Korrelationsanalyse der Mikrokernfrequenzen und der DNS-Migration nach Zugabe von Aqua bidest. als Kontrollsubstanz ergab eine sehr geringe Korrelation der Werte ohne Signifikanz.

4. Diskussion

4.1 Mutagensensitivität und Reparaturkapazität bei nierentransplantierten Patienten und Kontrollpersonen

4.1.1 Einflussnahme von Alter und Geschlecht

Sicherlich kann ein gewisser Einfluss individueller Faktoren der einzelnen Studienteilnehmer auf die Versuchsergebnisse niemals gänzlich ausgeschlossen werden, zumal zahlreiche Merkmale und Unterschiede der Individualpersönlichkeit nicht standardisiert erfassbar sind. Dennoch wurde im Rahmen dieser Studie versucht, diese Effekte so gering wie möglich zu halten. Die an die Kontrollgruppenpersonen gestellten Ausschlusskriterien, zu denen Malignomerkrankungen, Immundefektsyndrome oder Langzeitmedikation mit Glukokortikoiden zählten, sollten es ermöglichen, den nierentransplantierten Patienten ein für die gesunde Normalbevölkerung möglichst repräsentatives Kontrollkollektiv gegenüber zu stellen. Um eventuellen Verfälschungen der Versuchsergebnisse durch schlechte Übereinstimmung des Alters von Patienten und Kontrollpatienten vorzubeugen, wurde jedem Patienten ein gleichgeschlechtlicher Kontrollpatient zugeordnet, dessen Alter bis auf zwei Jahre Altersunterschied abgestimmt war. Wie aus 4.1 ersichtlich, gewährleistete dieses individuelle Matching eine gute Übereinstimmung des Alters von Patienten- und Kontrollkollektiv, so dass hierdurch keine größere Einflussnahme auf die Versuchsergebnisse zu erwarten ist.

4.1.2 Vergleich der Lymphozytenzahlen von Patienten und Kontrollpersonen

Die immunsuppressive Medikation nierentransplantierter Patienten verringert die Zahl und beeinträchtigt die Funktion von Lymphozyten und anderen Zellen, die der Immunabwehr dienen. Aus diesem Grund erfolgte ein Vergleich der Lymphozytenanzahlen des Patienten- und des Kontrollkollektivs. Unmittelbar nach Wiederauftauen der unter Zusatz von DMSO (Dimethylsulfoxid) eingefrorenen Zellen wurde die Anzahl der in der Probe enthaltenen Lymphozyten bestimmt. Der Vergleich der Zellzahlen von Nierentransplantierten und Kontrollpersonen zeigte bei den Nierentransplantierten keine verringerten sondern durchschnittlich sogar etwas höhere Zellzahlen als bei den Kontrollpersonen. Ein signifikanter Unterschied konnte insgesamt nicht festgestellt werden.

4.1.3 Vergleich der Vitalitäten der Lymphozyten von nierentransplantierten Patienten und Kontrollpersonen

Im Versuchsverlauf erfolgten regelmäßige Bestimmungen des Anteils vitaler Zellen an der Gesamtzahl der Lymphozyten von Patienten und Kontrollpersonen. Derartige Vitaliätstests wurden unmittelbar nach dem Auftauen der Zellansätze, direkt nach einstündiger Inkubation unter Zusatz von Aqua bidest. und NDEA sowie nach 15, 30 und 60 Minuten Reparaturdauer durchgeführt. Diese Vitalitätstests dienten der Erfassung möglicher Unterschiede in den Anteilen vitaler Lymphozyten bei Patienten und Kontrollpersonen. Eine Verringerung des Anteils vitaler Zellen kann beispielsweise durch Membranschäden bei der mechanischen Probenverarbeitung, durch die zytotoxische Wirkung von Dimethylsulfoxid (DMSO) oder durch die Testsubstanz N-Nitrosodiethylamin (NDEA) verursacht werden.
Tatsächlich zeigten die Lymphozyten der nierentransplantierten Patienten zu Versuchsbeginn zwar signifikant niedrigere Vitalitätswerte als die Lymphozyten der Kontrollpersonen. Nach 60 Minuten Reparaturdauer jedoch war der Anteil vitaler Lymphozyten in der Patientengruppe signifikant höher als der in der Kontrollgruppe beobachtete. Ursächlich hierfür war vermutlich der deutlich schlechte Vitalitätswert der weiblichen Kontrollpersonen nach 60 Minuten Reparaturzeit. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass in dieser Studie kein Anhaltspunkt für eine erhöhte Instabilität der Lymphozytenmembran Nierentransplantierter gefunden werden konnte.

4.1.4 Vergleich der Mittelwerte der DNS-Migrationen von nierentransplantierten Patienten und Kontrollpersonen

Die Auswirkungen der Langzeitimmunsuppression auf die Lymphozytenpopulation des Körpers bestehen zum einen in einer verminderten Bildung und Regeneration und damit in einer verminderten Zahl dieser Zellen. Zum anderen wird durch die immunsuppressive Therapie auch das Migrationsverhalten der Lymphozyten im Körper durch eine verminderte Bildung lymphozytärer Botenstoffe beeinträchtigt. Dies sind bekannte und gewollte Effekte der immunsuppressiben Therapie. Fraglich bleibt jedoch, ob unter den Bedingungen der Immunsuppression die Zellen des Immunsystems auch auf molekularer Ebene beeinträchtigt werden. Diese Beeinträchtigung könnte beispielsweise in einer erhöhten Mutagensensitivität resultieren, das heißt in einer erhöhten Empfindlichkeit der DNS gegenüber genotoxischen Substanzen. Als Ursache hierfür käme vor allem eine Verminderung der Fähigkeit in Frage, entstandene Schäden in der Erbinformation wieder zu beheben, also eine reduzierte Repara-

turkapazität. Gerade die DNS-Reparatur ist maßgeblich an der Bewahrung der Intaktheit des Genoms beteiligt und stellt einen der Hauptabwehrmechanismen der Karzinogenese dar. So kann bei allen bekannten erblichen Syndromen, die mit einem Defekt der DNS-Reparatur einhergehen, eine erhöhte Inzidenz maligner Erkrankungen beobachtet werden [Hsu, 1987; Auerbach und Allen, 1991]. Zu diesen Syndromen zählen Xeroderma pigmentosum, Fanconi Anämie, Ataxia teleangiectatica, das Bloom Syndrom und das Werner Syndrom [Hsu, 1987; Auerbach und Allen, 1991].

Ein auch bei nierentransplantierten Patienten nachweisbares Defizit der DNS-Reparaturmechanismen könnte eine Erklärung für die erhöhte Inzidenz maligner Erkrankungen bei dieser Patientengruppe liefern.

Die Lymphozytenreparaturversuche mit Zellen Nierentransplantierter und gesunder Kontrollpersonen wurden durchgeführt, um Antworten auf diese Fragestellung zu finden. Möglicherweise in der Aktivität der DNS-Reparaturenzyme bestehende Unterschiede zwischen beiden Gruppen sollten mit dem Comet Assay als quantitative Methode zum Nachweis fremdstoffinduzierter DNS-Schäden erfasst und analysiert werden.

Beim Vergleich der OTM-Mittelwerte der Lymphozytenreparaturversuche von Patienten und Kontrollpatienten zeigte sich folgendes Verlaufsmuster: Für die Kontrolle mit Aqua bidest. ergaben sich für Patienten und Kontrollpatienten nahezu identische Mittelwerte, die knapp unterhalb des OTM-Wertes von 2 lagen, ab dem eine Schädigung der Lymphozyten-DNS allgemein angenommen wird [Olive et al., 1991]. Unter den 80 Einzelkernen je Versuchsansatz befinden sich auch vereinzelte DNS-Konglomerate mit hohem Einzel-OTM-Wert, die in die Berechnung des Gesamtwertes miteingehen. Durch technisch bedingte Membranschädigungen, wie sie z.B. durch die Zentrifugation, durch das Auftauen der Zellen vor Versuchsbeginn oder durch Schereffekte beim Pipettieren verursacht werden, kommt es zu einer Auslösung fragmentierter DNS aus zugrunde gegangenen Zellen. Hierdurch lässt sich das Auftreten von DNS-Migrationen bei Zellansätzen, die mit keiner Noxe behandelt wurden, erklären [Singh et al., 1988]. Aus diesem Grund wurde für jeden Versuchteilnehmer eine Kontrolle mit Aqua bidest. durchgeführt. Aus den vorliegenden niedrigen Ergebnissen für die Kontrolle mit Aqua bidest. folgt, dass die Zugabe von Aqua bidest. als Kontrollsubstanz keine DNS-Fragmentierung in einem Ausmaß ausgelöst hat, das zu der Vermutung einer erfolgten DNS-Schädigung Anlass gibt.

Unmittelbar nach Zugabe des schädigenden Agens NDEA, wie auch nach 15 und 30 Minuten Reparaturzeit, konnten keine signifikanten Unterschiede der OTM-Mittelwerte und damit der DNS-Fragmentierungsgrade von nierentransplantierten Patienten und Kontrollpersonen nachgewiesen werden. Dennoch zeigten die nierentransplantierten Patienten unmittelbar nach Zugabe von NDEA eine höhere DNS-Schädigung ihrer Lymphozyten. Bereits nach 15 Minuten Reparaturdauer jedoch lagen die OTM-Mittelwerte der Patientengruppe wieder unter

dem Wert der Kontrollgruppe. Diese Tendenz verstärkte sich nach 30 Minuten. Ein signifikanter Unterschied der OTM-Mittelwerte zwischen nierentransplantierten Patienten und Kontrollpersonen ergab sich schließlich nach 60minütigem Reparaturintervall. Hier lag das Ausmaß der DNS-Fragmentierung bei den Lymphozyten der Kontrollpersonen signifikant über dem der Lymphozyten der Patienten. Bei höherer Ausgangsschädigung zeigten die Lymphozyten der nierentransplantierten Patienten somit 60 Minuten nach Schädigung einen geringeren Grad der DNS-Schädigung als diejenigen der Kontrollgruppe. Dies wurde ebenso im Einzelvergleich von weiblichen Patienten und Kontrollpatienten nach 60 Minuten Reparaturdauer deutlich, wo die weiblichen Kontrollpersonen signifikant höhere OTM-Mittelwerte aufwiesen als die weiblichen Nierentransplantierten. Beim Vergleich von männlichen Nierentransplantierten und männlichen Kontrollpersonen ergaben sich zu keinem Versuchszeitpunkt signifikante Unterschiede.
Bemerkenswert ist der leichte Wiederanstieg der Schädigung nach 60 Minuten im Vergleich zur Schädigung nach 30 Minuten Reparaturdauer, der bei männlichen Patienten und männlichen Kontrollpersonen zu beobachten war.
Beim Vergleich von männlichen und weiblichen Patienten wie auch von männlichen und weiblichen Kontrollpatienten zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Eine Geschlechtsabhängigkeit der Reparaturfähigkeit der Lymphozyten lässt sich daher aus den Ergebnissen dieser Studie nicht ableiten.

4.1.5 Vergleich der Mediane der DNS-Migrationen von nierentransplantierten Patienten und Kontrollpersonen

Ein detaillierter Vergleich der Mediane der OTM-Werte von Patienten und Kontrollpersonen wurde durchgeführt. Der Vorteil der Verwendung von Medianen besteht in der geringeren Beeinflussung der Ergebnisse durch Ausreißer und Extremwerte, die in die Mittelwerteberechnung mit eingehen. Der Vergleich der Mediane der OTM-Werte von nierentransplantierten Patienten und Kontrollpersonen ergab für alle Versuchsschritte signifikant niedrigere Medianwerte der nierentransplantierten Patienten, die Messung unmittelbar nach Zusatz von NDEA ausgenommen.
Bei der Werteanalyse von männlichen Patienten und Kontrollpersonen ergaben sich signifikant höhere Medianwerte der männlichen Kontrollpersonen vor Inkubation, für die Kontrolle mit Aqua bidest. sowie nach 15, 30 und 60 Minuten Reparaturdauer. Nicht signifikant fiel der Vergleich der Werte unmittelbar nach Schädigung aus. Zudem war dies der einzige Versuchsschritt, bei dem die männlichen Nierentransplantierten einen höheren Median der OTM-Werte aufwiesen als die Kontrollpersonen.

Obwohl die weiblichen Kontrollpersonen bei allen Versuchsschritten tendenziell höhere Medianwerte der DNS-Schädigung zeigten als die weiblichen Patienten, wurde beim Vergleich von weiblichen Patienten und Kontrollpersonen Signifikanz nur für die Kontrolle mit Aqua bidest. erreicht.
Beim Vergleich der Mediane von männlichen und weiblichen Patienten sowie von männlichen und weiblichen Kontrollpersonen ergaben sich keine Unterschiede.
Die schon beim Vergleich der Mittelwerte gemachte Beobachtung, dass die Geschlechtszugehörigkeit ohne Einfluss auf die Reparaturfähigkeit blieb, zeigte sich auch beim Vergleich der Mediane.

4.1.6 Varianzanalyse des Verlaufs der Lymphozytenreparatur anhand der Mittelwerte und Mediane der DNS-Migrationen von nierentransplantierten Patienten und Kontrollpersonen

Mit dem allgemeinen linearen Modell für Messwiederholungen wurde eine Varianzanalyse der Mittelwerte und der Mediane der DNS-Migrationen von nierentransplantierten Patienten und gesunden Kontrollpersonen im Vergleich während des Verlaufs der Lymphozytenreparaturversuche durchgeführt.
Der Test der Innersubjektkontraste diente der Erfassung von Unterschieden im Kurvenverlauf der Reparaturverläufe von nierentransplantierten Patienten und Kontrollpersonen. Dabei ergaben sich beim Vergleich der Mittelwerte signifikante Ergebnisse für die lineare und für die kubische Verlaufsprüfung. Beim Vergleich der Mediane ergaben sich bei allen Verlaufsprüfungen keine signifikanten Unterschiede.
Die Analyse mittels multivariater Tests ergab für den Mittelwertevergleich für die Kontrolle mit Wasser, für 0 und für 15 Minuten Reparaturdauer kein signifikantes Ergebnis. Dagegen zeigte sich im Vergleich der Mittelwerte nach 30-minütigem Reparaturintervall, dass die mittlere Schädigung der Kontrollpersonen hier signifikant höher lag als die der Nierentransplantierten. Dieser Unterschied verstärkte sich nach einem Reparaturintervall von 60 Minuten: wieder lag die mittlere Schädigung der Kontrollpatienten signifikant höher als die der Patienten.
Die Analyse der Mediane mittels multivariater Tests ergab signifikant höhere Werte der Kontrollpersonen für die Kontrolle mit Aqua bidest., sowie nach 15, 30 und 60 Minuten Reparaturdauer. Diese Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen, die bei der Analyse der Mittelwerte und Mediane von Patienten und Kontrollpersonen mit dem Mann-Whitney U-Test gemacht wurden.

4.1.7 Überprüfung der Einflussnahme der Lymphozytenvitalitäten auf die DNS-Migration

Ein wesentliches Problem beim Vergleich der Reparaturkapazität von Lymphozyten stellt die Frage dar, ob und in welchem Maße hohe Anteile avitaler Zellen in der Probe die Ergebnisse der Mikrogelelektrophorese beeinflussen können. Die DNS von Zellen, deren Membranen bereits zu Versuchsbeginn zerstört waren, liegt frei im Versuchsansatz vor und erscheint nach Elektrophorese und Fluoreszenzfärbung nur mehr bruchstückhaft. Diese stark fragmentierte DNS wird bei der mikroskopischen Auswertung mitbeurteilt und beeinflusst somit das Gesamtergebnis [Singh et al., 1988].
Um mögliche Einflüsse der Lymphozytenvitalitäten auf die OTM-Mittelwerte der Patienten und Kontrollpatienten auszuschließen, erfolgte die Varianzanalyse der Mittelwerte wie auch der Mediane unter Beachtung der Zellvitalitäten des jeweiligen Versuchsabschnittes als Kovariate. Ein wesentlicher Einfluss der Zellvitalitäten auf die Reparaturverläufe von Patienten und Kontrollpersonen konnte dabei nicht nachgewiesen werden. Dabei darf jedoch nicht außer acht gelassen werden, dass die durchschnittlichen Zellvitalitäten der Nierentransplantierten und der Kontrollpersonen deutlich über 80 % lagen und der Anteil avitaler Zellen somit bei beiden Gruppen gering war.

4.1.8 Diskussion der Ergebnisse der Lymphyzytenreparaturversuche

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Ergebnisse der Mittelwerteanalyse mit den unter Zugrundelegung der Mediane gemachten Berechnungen in den wesentlichen Punkten übereinstimmen. Unmittelbar nach Schädigung zeigten die Lymphozyten der Nierentransplantierten einen tendenziell höheren Fragmentierungsgrad der DNS als die der Kontrollpersonen. Signifikant war dieser Unterschied jedoch weder beim Vergleich der Mittelwerte, getrennt nach Status oder nach Geschlecht, noch beim Vergleich der Medianwerte für Patienten und Kontrollpersonen insgesamt oder nach Geschlechtsauftrennung. Mit zunehmender Reparaturdauer kehrte sich dieses Verhältnis um, so dass nun die Nierentransplantierten nierdrigere OTM-Werte als Maß für die DNS-Fragmentierung aufwiesen. Insbesondere nach 60-minütigem Reparaturintervall wies deren Lymphozyten-DNS ein signifikant niedrigeres Schädigungsausmaß auf als die Lymphozyten-DNS der Kontrollgruppenpersonen. Dieser Effekt ließ sich auch beim Mittelwertevergleich von weiblichen Patienten und Kontrollpersonen, bei der Analyse der Mediane von Patienten- und Kontrollkollektiv, wie auch von männlichen Patienten und Kontrollpersonen reproduzieren. Somit lässt sich festhalten, dass die OTM-Mittelwerte und Mediane, die als Maß für den DNS- Fragmentierungsgrad dienen, bei

der Gruppe der nierentransplantierten Patienten trotz höherer Ausgangsschädigung unmittelbar nach Zugabe des schädigenden Agens NDEA im Verlauf des einstündigen Reparaturintervalls eine niedrigere Endschädigung der Erbinformation anzeigten, als diejenigen der Kontrollgruppe. Die Hypothese, dass die DNS-Reparaturmechanismen der Lymphozyten Nierentransplantierter im Vergleich zu Gesunden im allgemeinen Defizite aufweisen, lässt sich mit den Nachweismethoden dieser Studie somit nicht stützen. Dies gilt zumindest für die erste Stunde der DNS-Reparatur. Fraglich bleibt jedoch, wie sich die Reparaturaktivitäten von Patienten und Kontrollpersonen im Verlauf eines längeren Beobachtungszeitraumes entwickeln. In Studien mit dem Comet Assay als Methode zur Quantifizierung der DNS-Reparatur wird angegeben, dass strahleninduzierte DNS-Schäden 30 Minuten bis zwei Stunden nach Expositionen bis zu 15 Gy in einem Maße repariert werden, dass wieder die Normalwerte vor Exposition erreicht werden [Olive et al., 1990]. Die Durchführung von DNS-Reparaturversuchen mit dem Comet Assay, bei denen Hamsterzellen als Material dienten, ergab, dass nach zwei Stunden 85 % der DNS-Strangbrüche repariert waren [Olive et al., 1991]. Von einer vollständigen Reparatur der Schädigung kann nach einer Stunde Reparaturzeit somit nicht ausgegangen werden. Aus diesem Grunde wäre es interessant, ähnliche Studien wie die hier vorliegende mit gleicher Methodik, aber über einen längeren Zeitraum durchzuführen, um die weitere Entwicklung der DNS-Reparatur in Patienten- und Kontrollgruppenlymphozyten beobachten zu können.

Mehrere Studien haben sich bereits mit der DNS-Reparaturkapazität in Lymphozyten von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz und von Patienten unter Langzeitdialyse beschäftigt. Dabei konnte eine deutlich erniedrigte DNS-Reparaturkapazität von Lymphozyten urämischer Patienten im Vergleich zum Normalkollektiv nachgewiesen werden [Friedman et al., 1988]. Studien, die sich mit DNS-Reparaturmechanismen in Lymphozyten urämischer Patienten nach Einwirken von UV- oder ionisierender Strahlung befassten, konnten eine bis auf 60 % der Kontrollgruppenwerte reduzierte Reparaturfähigkeit bei Patienten mit terminalem Nierenversagen ohne Dialysebehandlung aufzeigen [Malachi et al., 1993]. Urämische Patienten, die regelmäßig hämodialysiert wurden, zeigten jedoch gegenüber der Kontrollgruppe kein Reparaturdefizit [Malachi et al., 1993; Vamvakas et al., 1996]. Als Methode diente hierbei jedoch nicht der Comet Assay, sondern das Verfahren der Ungeplanten DNS-Synthese, die mittels radioaktiv markierten Thymidins über die Bestimmung der Thymidin-Aufnahme Aussagen über die Aktivität der DNS-Reparaturmechanismen erlaubt. Vamvakas et al. beschrieben Unterschiede in der Lymphozytenreparaturkapazität bei verschiedenen Gruppen von Dialysepatienten, die in unterschiedlichen Zeiträumen mit Hämodialyse behandelt worden waren. Als Methode diente auch hier die Bestimmung der Thymidin-Aufnahme der Patientenlymphozyten nach einem durch UV-Strahlung induzierten DNS-Schaden. Für die Gruppen der Kurzzeitdialyseempfänger, die weniger als 3 Monate und 3-12 Monate hämodialy-

siert worden waren, konnte bei einer Bestrahlungsintensität von 9 Joule pro m^2 der Nachweis einer gegenüber der gesunden Kontrollgruppe signifikant erhöhten DNS-Reparaturaktivität erbracht werden. Nach Bestrahlung mit der doppelten Intensität (18 J pro m^2) stimmten die Reparaturaktivitäten dieser beiden Gruppen mit denen der Kontrollgruppe weitgehend überein. Begründet wird diese im Vergleich zum Normalkollektiv erhöhte Reparaturkapazität durch die deutliche Verbesserung der Retentionsparameter im Serum dieser Patienten im Gegensatz zu ihrer vorherigen Situation im Stadium des terminalen Nierenversagen. Dagegen zeigten Langzeitdialysepatienten und Patienten unter Hämodialyse, die zugleich an einer malignen Erkrankung litten, bei der Bestrahlungsintensität von 18 Joule pro m^2 niedrigere DNS-Reparaturaktivitäten als die Kontrollgruppenpersonen. Als Gründe für diese Beobachtung werden die Auswirkungen auf das Immunsystem, die insbesondere unter Langzeitdialyse zunehmen in Erscheinung treten, angeführt [Vamvakas et al., 1996].

Diese Beobachtungen sind auch für die hier vorliegende Studie in mehrfacher Hinsicht von Bedeutung und liefern Erklärungen für die soeben erläuterten Ergebnisse. Ebenso wie bei Nierentransplantierten ist auch bei Dialyseempfängern das Malignomrisiko im Vergleich zur Normalbevölkerung deutlich erhöht [Cuckovic et al., 1996; Maisonneuve et al., 1999]. Ein Defizit der Immunabwehr besteht nachweisbar auch bei Dialysepatienten [Cengiz et al., 1988]. Die Erhöhung des Malignomrisikos unter Langzeitimmunsuppression nach erfolgreicher Nierentransplantation gegenüber dem unter chronischer Hämodialyse bestehenden Risiko wird in der Literatur verneint [Pecqueux et al., 1990]. Demzufolge soll die medikamentöse Immunsuppression keinen zusätzlichen Risikofaktor für Patienten, die jahrelange Hämodialyse benötigt haben, darstellen [Pecqueux et al., 1990]. Da zumindest für Dialyseempfänger, die sich bis zu einem Jahr im Dialyseprogramm befanden, kein Defizit der DNS-Reparaturfähigkeit in Lymphozyten nachgewiesen werden konnte, ist es unwahrscheinlich, bei Nierentransplantierten ein anderes Ergebnis zu erhalten. Darüberhinaus sollte nicht unberücksichtigt bleiben, dass Dialysepatienten im Vergleich zu Nierentransplantierten deutlich stärker unter dem Anfallen harnpflichtiger Substanzen zu leiden haben und wiederholt urämischen Episoden ausgesetzt sind, was sich negativ auf das Immunsystem auswirkt [Vamvakas et al., 1996]. In derselben Studie befassten sich Vamvakas et al. auch mit der DNS-Reparaturfähigkeit von Lymphozyten nierentransplantierter Personen [Vamvakas et al., 1996]. Dabei erfolgte eine Einteilung in eine Nierentransplantiertengruppe, die erst seit kurzer Zeit (durchschnittlich 3,6 Monate) und in eine Gruppe, die schon seit mehreren Jahren (durchschnittlich 81 Monate) transplantiert waren. Diesen wurde ein Kollektiv Nierentransplantierter, die an einer Krebserkrankung litten, eine gesunde Kontrollgruppe sowie einer Gruppe Nierengesunder mit maligner Erkrankung gegenübergestellt. Dabei zeigte die Gruppe nierentransplantierter Krebskranker sowohl bei einer Bestrahlungsintensität von 9 als auch von 18 Joule pro m^2 im Vergleich zur Kontrollgruppe wie auch zu allen übrigen Grup-

pen signifikant reduzierte DNS-Reparaturaktivitäten. Das Kollektiv nierengesunder Krebspatienten dagegen wies bei beiden UV-Intensitäten eine auf das 1,5-fache und damit signifikant höhere DNS-Reparaturaktivität auf als die Kontrollgruppe [Vamvakas et al., 1996].
Die Kurzzeittransplantierten zeigten nach Bestrahlung von 9 Joule zwar eine der Kontrollgruppe gegenüber signifikant erniedrigte Reparaturkapazität, nach Bestrahlung mit 18 Joule jedoch lag die Reparaturaktivität der Kurzzeittransplantierten sogar leicht über derjenigen der Kontrollgruppe. Die Langzeittransplantierten zeigten bei beiden Bestrahlungsintensitäten Werte, die weitgehend denen der Kontrollpersonen entsprachen.
Zwar handelt es sich bei der von Vamvakas et al. eingesetzten Methode um ein Verfahren, das sich zweifellos von dem in dieser Studie verwendeten Comet Assay unterscheidet. Dennoch stellen beide Methoden quantitative Verfahren dar, die auf die Erfassung der DNS-Reparaturkapazität in demselben Zellmaterial ausgerichtet sind. Somit erlauben beide es, Aussagen über die Aktivitäten der beteiligten Reparaturenzyme zu treffen. Ein Vergleich der Ergebnisse von Vamvakas et al. mit den hier vorliegenden Werten ist somit durchaus zulässig. Wie in der vorliegenden Studie mit dem Comet Assay konnte auch von Vamvakas et al. kein Beweis für eine im Vergleich zum Normalkollektiv generell reduzierte DNS-Reparaturkapazität bei nierentransplantierten Patienten erbracht werden. Die anhand des OTM-Mittelwert- und besonders des Medianvergleiches von Patienten- und Kontrollkollektiv gemachte Beobachtung, dass Transplantierte mitunter sogar höhere Reparaturaktivitäten zeigen als Gesunde, korrespondiert in gewissem Sinne mit der Messung der - wenn auch nicht signifikant - erhöhten Thymidin-Aufnahme der Kurzzeittransplantierten nach einer Bestrahlungsintensität von 18 Joule pro m^2. Die Transplantationszeit der in dieser Studie beteiligten Nierentransplantierten variierte zwischen einem und 192 Monaten, der Durchschnittswert betrug 54,7 Monate und liegt damit zwischen den durchschnittlichen Angaben für die Transplantationsdauer der Kurzzeit- und Langzeittransplantierten in der Studie von Vamvakas et al.
Die weitgehend mit den Werten der gesunden Kontrollgruppe übereinstimmenden Reparaturaktivitäten der nierentransplantierten Patienten wird folgendermaßen interpretiert: Die DNS-Reparaturmechanismen weisen bei Patienten mit terminalem Nierenversagen deutliche Defizite auf. Die Transplantation einer funktionsfähigen Niere ermöglicht den DNS-Reparaturmechanismen die Wiederaufnahme der vollen Aktivität durch Verbesserung der Serumparameter. Dies bedingt zumindest bei einem Teil der Nierentransplantierten einen Wiederanstieg der Reparaturaktivitäten auf ein Normalniveau [Vamvakas et al., 1996], wie es die OTM-Mittelwerte im Comet Assay in der vorliegenden Untersuchung und die Thymidin-Aufnahmeraten in der angeführten Studie belegen.
Dennoch zeigt der Vergleich von Tumorpatienten mit und Tumorpatienten ohne Nierentransplantation, bei denen die Reparaturaktivität auf das bis zu 6-fache der Werte der Gruppe der

nierentransplantierten Krebspatienten erhöht war [Vamvakas et al., 1996] an, dass wesentliche Unterschiede zwischen beiden Gruppen vorliegen müssen. Gerade bei Personen mit Malignomerkrankung hat die medikamentösen Immunsuppression eine entscheidende Wirkung auf das Reparatursystem der DNS. Während dieses bei Nicht-Immunsupprimierten durch die Anwesenheit von Tumorantigenen eine Stimulation erfährt, so dass eine im Vergleich zum Normalkollektiv deutlich erhöhte Aktivität resultiert, wird diese Aktivierung durch die medikamentöse Immunsuppression unterdrückt. Nicht anders verhält es sich bei der Immunsuppression unter chronischer Hämodialyse [Vamvakas et al., 1996].
Ein interessanter Ansatz für die weitere Forschung nach Reparaturdefiziten bei Nierentransplantierten mit dem Comet Assay besteht darin, die Lymphozytenreparaturversuche zwar in der in dieser Studie angewendeten Form, jedoch an ähnlich wie in der Studie von Vamvakas et al. aufgeteilten Gruppen von Nierentransplantierten zu wiederholen. Die Unterteilung in Kurz- und Langzeittransplantierte scheint von Bedeutung für die Reparaturergebnisse zu sein. Darüber hinaus könnte auch eine Einteilung der Transplantierten nach Dauer der Hämodialysezeit vor Transplantation weitere Einblicke in die unterschiedlichen Auswirkungen auf das DNS-Reparatursystem liefern. Auch eine Unterscheidung des Patientenstammes nach nephrologischen Vorerkrankungen erscheint in diesem Zusammenhang durchaus sinnvoll. In der vorliegenden Studie unterblieb eine weiter Unterteilung des Patientenstammes nach Transplantationsdauer, da insbesondere die Anzahl der Kurzzeittransplantierten mit 3 Personen zu gering war. Alle an dieser Studie beteiligten Patienten waren zuvor Langzeitdialyseempfänger (Minimum 18 Monate). Eine Unterteilung der nierentransplantierten Patienten nach Vorerkrankungen unterblieb aufgrund der zu geringen Fallzahlen für die jeweilige Erkrankungsgruppe.

4.1.9 Überpfüfung der Einflussnahme der immunsuppressiven Medikation mit Cyclosporin A auf die DNS-Reparaturkapazität

Eine ursächliche Beteiligung der medikamentösen Immunsuppression bei der Malignomentstehung nach Organtransplantation wird angenommen [Vilardell et al., 1992]. Mittlerweile existiert eine Vielzahl an Substanzklassen, die klinisch zur Anwendung kommt. Diese unterscheiden sich durch ihre Herkunft, wie auch durch die unterschiedlichen Angriffspunkte im Immunsystem. Eine wichtige Substanz stellt in diesem Zusammenhang das Immunsuppressivum Cyclosporin A dar.
Cyclosporin A ist das Produkt der Pilze *Cylindrocarpon lucidum* und *Trichoderma polysporum*. Bei Cyclosporin A handelt es sich um einen selektiven Inhibitor von Effektorfunktionen bei T-Lymphozyten sowie der T-Lymphozyten-Proliferation in vitro. Diese Wirkung kommt

durch die Hemmung der Interleukin-2-Transkription in diesen Zellen zustande. Obwohl Cyclosporin A auf diese Weise die Aktivierung von Lymphozyten verhindert, wird die durch primäre Abwehrmechanismen, wie beispielweise natürliche Killerzellen, Schleimhautimmunität oder das Komplementsystem gewährleistete Immunität nicht beeinträchtigt. So bleibt die primäre Abwehrfunktion des Organismus gegenüber viralen und bakteriellen Krankheitserreger durch die bei nierentransplantierten Patienten verwendete niedrige Dosierung unbeeinträchtigt. Generell konnte unter Cyclosporintherapie im Vergleich zur herkömmlichen Therapie mit Azathioprin und Prednison ein besseres Transplantatüberleben vermerkt werden [Thiel et al., 1994].

Mit der Aufnahme von Cyclosporin in das immunsuppressive Therapieregime hat sich das Muster der Malignomerkrankungen bei Nierentransplantierten in mehrfacher Hinsicht verändert. So konnte unter Cyclosporin A-Therapie insbesondere ein vermehrtes Auftreten maligner Lymphome vom Non-Hodgkin-Typ (NHL), von Kaposi Sarkomen, Nierenzellkarzinomen und malignen Erkrankungen endokriner Organe beobachtet werden. Bei Personen, die herkömmliche Immunsuppressiva wie Azathioprin oder Cyclophosphamid erhielten, zeigten sich demgegenüber niedrigere Inzidenzen dieser Erkrankungen. Auch war die Latenzzeit zwischen Transplantation und Auftreten der Malignome bei dem mit Cyclosporin behandelten Patientenstamm deutlich kürzer [Penn, 1987; Penn, 1988a; Vilardell et al., 1992]. Ob nun unter der Therapie mit Cyclosporinderivaten generell eine Zunahme maligner Erkrankungen bei Transplantierten zu befürchten ist, bleibt fraglich [Weinstein et al., 2000]]. Entscheidend scheint jedoch zu sein, ob Cyclosporin allein oder in Kombination mit anderen Immunsuppressiva gegeben wird, da nur in letzterem Fall eine deutliche Zunahme der Malignominzidenz verzeichnet werden konnte [Penn, 1987; Herman et al., 2001].

Eine direkte genotoxische Wirkung von Cyclosporin zeigte sich bei in vitro Studien mit menschlichen Zellen. Hierbei zeigte sich, dass Cyclosporin durch Induktion des Austausches von Schwesterchromatiden mutagen wirken kann [Penn, 1987].

Neue Studien haben sich insbesondere mit der Auswirkung einer Therapie mit Cyclosporin A in Kombination mit anderen gängigen Immunsuppressiva auf die DNS-Reparatur und auf die Tumorinzidenz bei nierentransplantierten Patienten befasst [Weinstein et al., 2000; Herman et al., 2001]. Dabei wurden zwei je nach immunsuppressivem Therapieschema aufgeteilte Gruppen von nierentransplantierten Patienten mit einem gesunden Kontrollkollektiv verglichen. Die Patienten der ersten Gruppe wurden mit einer Zweifachkombinationstherapie, bestehend aus Azathioprin und Prednison, behandelt. Die zweite Gruppe erhielt eine Dreifachkombination aus Cyclosporin A, Azathioprin und Prednison. Als Methode zur Messung der DNS-Reparaturaktivitäten diente die Bestimmung der Thymidin-Aufnahme in mononukleären Zellen des peripheren Blutes nach Induktion eines DNS-Schadens mittels UV-Bestrahlung. Die DNS-Reparaturaktivität in den Zellen der Zweifachtherapiegruppe unterschied sich nicht

signifikant von der bei der Kontrollgruppe gemessenen Aktivität. Anders verhielten sich jedoch die Reparaturaktivitäten der Dreifachtherapiepatienten: Hier waren die Reparaturwerte im Vergleich zu den bei den Kontrollpersonen gemessenen Ergebnissen um 35 % und somit signifikant vermindert [Weinstein et al., 2000; Herman et al., 2001]. Unter der immunsuppressiven Therapie mit Cyclosporin A konnte eine deutliche Zunahme der Malignominzidenz insbesondere dann verzeichnet werden, wenn Cyclosporin A in Kombination mit anderen Immunsuppressiva gegeben wurde [Penn, 1987]. Cyclosporin A steht zudem im Verdacht, durch Beeinflussung der zellulären Kalziumhomöostase die DNS-Reparaturfähigkeit in Lymphozyten, die ein von der intrazellulären Kalziumkonzentration abhängiger Vorgang ist, zu beeinträchtigen [Ahlers et al., 1999; Weinstein et al., 2000].

Aus diesen Gründen wurde auch in der vorliegenden Studie ein Vergleich der DNS-Reparaturergebnisse der Gruppe der nierentransplantierten Patienten, bei denen Cyclosporin A Bestandteil der immunsuppressiven Medikation war, und der Patienten, die kein Cyclosporin A, sondern Kombinationen von Tacrolimus oder Mycophenolat Mofetil und Steroiden erhielten, durchgeführt. Die Analyse erfolgte für jeden der sechs Versuchsschritte Schädigung vor Inkubation, Kontrolle mit Aqua bidest., 0, 15, 30 und 60 Minuten Reparaturdauer. Dabei ergab sich jedoch weder beim Vergleich der OTM-Mittelwerte noch bei der Analyse der Mediane ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Das mag dadurch begründet sein, dass lediglich nach der Gabe von Cyclosporin A unterschieden wurde. Eine weitere Auftrennung nach anderen Medikamentengruppen unterblieb, da die Fallzahlen nach Unterteilung der Patienten nach den verschiedenen Medikamentenkombinationen zu gering waren. Dies ist insofern von Bedeutung, als in der Literatur nach wie vor Unsicherheit darüber besteht, ob Cyclosporin A selbst die nachgewiesene Reduktion der DNS-Reparatukapazität bedingt, oder ob dieser Effekt durch die Gabe von mehreren, im Falle der zitierten Studie von drei Immunsuppressiva in Kombination verursacht wird [Penn, 1987; Weinstein et al., 2000; Herman et al., 2001]. Im letzteren Fall wäre die verringerte Reparaturfähigkeit die Folge der aggressiveren Behandlung und nicht der Substanz selbst. Auch der Dosierung von Cyclosporin A scheint in diesem Zusammenhang große Bedeutung zuzukommen [Weinstein et al., 2000]. In dieser Studie erhielten die meisten Patienten Dreifachkombinationen unterschiedlicher Medikamente. Die beiden häufigsten waren Cyclosporin A in Kombination mit Mycophenolat Mofetil und Methylprednison sowie eine Kombination aus Tacrolimus (FK 506), Mycophenolat Mofetil und Methylprednison. Bei zukünftigen Studien wäre es von Interesse, verschiedene Medikamentenkombinationen bei Nierentransplantierten bezüglich ihrer Auswirkungen auf die DNS-Reparaturfähigkeit mit größeren Fallzahlen genauer zu analysieren.

Trotz dieser noch bestehenden Unsicherheiten in bezug auf die Kombinationstherapie mit Cyclosporin A gibt es Anhaltspunkte für eine direkte Wirkung von Cyclosporin A auf die DNS-

Reparatur. Ein spezifischer Effekt dieser Substanz auf die Reparaturfähigkeit von mononukleären Blutzellen besteht in der Beeinflussung der zellulären Calciumhomöostase [Ahlers et al., 1999]. Zahlreiche DNS Reparaturenzyme benötigen freies zytosolischen Calcium [Gafter et al., 1997]. In vitro Studien konnten belegen, dass Cyclosporin A die durch Calcium vermittelte Aktivitätserhöhung des DNS-Reparaturenzyms Polymerase β inhibiert. Diese Wirkung resultiert aus der durch Cyclosporin vermittelten Hemmung der Phosphatase Calcineurin [Ahlers et al., 1999]. Auch für die Veränderung des Musters der Malignomerkrankungen unter Cyclosporin A -Therapie gibt es erklärende Ansätze. Dabei handelt es sich um einen Effekt der Substanz selbst, der unabhängig von ihrer Wirkung auf die Zellen des Immunsystems ist. So konnten in vitro Studien nachweisen, dass Cyclosporin A die Eigenschaften mehrerer Tumorzellen verändert [Hojo et al., 1999]. Diese Zellen proliferierten unter Cyclosporinzusatz stärker und zeigten eine Tendenz zu invasivem Wachstum. Für diese Beobachtungen wird die Induktion der Synthese von Transforming Growth Factor β durch Cyclosporin verantwortlich gemacht [Hojo et al., 1999].

4.2 Vergleich der Bildung von Mikrokernen bei nierentransplantierten Patienten und Kontrollpersonen

Ein erhöhtes Auftreten abnormer Chromosomen wie beispielweise Ringchromosomen, eine verstärkte Chromosomenbrüchigkeit in Form von Mikrokernen sowie erhöhte Austauschraten von Schwesterchromatiden bei urämischen Patienten konnten bereits in mehreren Studien nachgewiesen werden [Cengiz et al., 1988]. Eine neuere Untersuchung, befasste sich mit spontanen Genomschäden bei Lymphozyten in Form von Mikrokernen bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz vor und während einer Langzeithämodialysebehandlung. Der Vergleich von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz mit einer gesunden Kontrollgruppe ergab signifikant höhere spontane Mikrokernfrequenzen bei den Nierenkranken. Ebenso zeigte die Gruppe der Hämodialysepatienten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöhte Zahlen von Mikrokernen [Stopper et al., 1999].
Fraglich bleibt, ob auch bei Nierentransplantierten mit erhöhten Frequenzen solcher abnormer Chromosomen aufgrund einer verstärkten Neigung zu Genominstabilitäten zu rechnen ist. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Studie der Mikrokerntest an Lymphozyten Nierentransplantierter durchgeführt und mit den Testergebnissen des Kontrollkollektivs verglichen, um eventuelle Unterschiede in der Genomstabilität beider Gruppen zu untersuchen. Mikrokerne stellen Chromosomenfragmente dar, die entweder aus ganzen Chromatiden oder aus meist in der Zentromerregion abgebrochenen Chromosomenarmen azentrischer Chro-

mosome bestehen. Lichtmikroskopisch imponieren Mikrokerne als kleine solitäre Kerne im Zytoplasma der Lymphozyten. Sie entstehen während des Kernteilungsvorganges einer Zellteilung, der Mitose, und werden nach vollendeter Kernteilung nicht in einen der beiden neu entstehenden Kerne aufgenommen, sondern liegen als kleiner separater Kern, als Mikronukleus, im Zytoplasma der neuen Zellen vor [Streffer, 1997].

4.2.1 Mikrokernfrequenz in Abhängigkeit vom Geschlecht

Bei der Analyse der Mikrokerntestergebnisse war die Frage nach Geschlechtsunterschieden bei der Häufigkeit der Mikrokerne von Interesse. Die Gesamtheit aller weiblichen Studienteilnehmer wies eine durchschnittliche Zahl von Mikrokernen auf, die mehr als das 1,5-fache derjenigen aller Männer betrug. In der statistische Analyse stellte sich dieser Unterschied signifikant dar. Nichts anderes ergab der Vergleich von Männern und Frauen innerhalb des Patienten- und innerhalb des Kontrollkollektivs.
Auch die Analyse der Korrelation von Ergebnissen des Mikrokerntests und Geschlechtszugehörigkeit der untersuchten Personen bestätigte die Abhängigkeit der Mikrokernfrequenz vom Geschlecht.
Diese Ergebnisse sind auffällig, zumal in der Literatur eine Geschlechtsabhängigkeit der Mikrokernanzahl in unbehandelten, das heißt nicht mit genotoxischen Substanzen inkubierten Lymphozyten nicht bestätigt wird [Gantenberg et al., 1991; Diem und Rüdiger, 1999].
Generell ist festzustellen, dass eine erhöhte Frequenz von Mikrokernen zwar ein Hinweis auf eine Instabilität des Genoms sein kann. Eine eindeutige Aussage über das tatsächliche Risiko für maligne Erkrankungen lässt sich aus der Mikrokernfrequenz jedoch nicht ableiten. Auch bei gesunden Personen unterliegt die Zahl von Mikrokernen in Lymphozyten starken interindividuellen Schwankungen [Gantenberg et al., 1991; Streffer, 1997]. Aus diesen Ergebnissen auf ein allgemein erhöhtes Malignomrisiko für Frauen zu schließen, wäre mit Sicherheit falsch. Dennoch geben die Ergebnisse dieser Studie Anlass, sich weiterhin mit dieser Thematik zu befassen. Hieraus könnten sich Ansätze für die Forschung nach den Enstehungsmechanismen bestimmter Malignomarten, die eine Geschlechtspräferenz zeigen, ableiten.

4.2.2 Korrelation von Mikrokernfrequenz und Alter

Ein Zusammenhang zwischen dem Alter der Untersuchten und dem spontanen Auftreten von Mikrokernen wird in der Literatur diskutiert. In Untersuchungen an menschlichen Fibroblastenkulturen konnte eine Korrelation zwischen der Zellalterung, der DNS-Reparaturkapazität und der Mikrokernfrequenz nachgewiesen werden [Weirich-Schweiger et al., 1994]. Ältere Personen sollen eine höhere Genominstabilität und damit größere Anzahlen von Mikrokernen aufweisen als jüngere [Diem und Rüdiger, 1999]. Diem und Rüdiger geben einen signifikanten Anstieg der Mikrokernfrequenz für die Gruppe der über 40-jährigen an [1999].
Die in dieser Arbeit durchgeführte Korrelationsanalyse von Ergebnissen des Mikrokerntests und Alter der Untersuchten ergab jedoch keinen Zusammenhang von Mikrokernhäufigkeit und Alter. Dies mag aber daran liegen, dass die meisten Studienteilnehmer eher der mittleren Altersgruppe angehörten. Dabei lag der Altersdurchschnitt für Patienten und Kontrollpersonen bei 47 Jahren (siehe auch unter 4.1). Personen unter 25 und über 69 Jahre waren an der Studie nicht beteiligt.
Auch Gantenberg et al. konnten beim Vergleich der Mikrokernhäufigkeit in unbehandelten Lymphozyten keine Altersabhängigkeit beobachten [Gantenberg et al., 1991]. Auch hier wird dies damit begründet, dass die Altersspanne der untersuchten Personen ebenfalls zu klein gewesen sei [Gantenberg et al., 1991].

4.2.3 Vergleich der Mikrokernfrequenzen von Patienten und Kontrollpersonen

Beim Vergleich der Mikrokerntestergebnisse der nierentransplantierten Patienten und der Kontrollpersonen ergab sich kein signifikanter Unterschied. Nicht anders fielen auch die Vergleiche von männlichen Patienten und Kontrollpersonen, sowie von weiblichen Patienten und Kontrollpersonen aus.
Eine gegenüber der Normalbevölkerung erhöhte Mikrokernfrequenz und damit eine gesteigert Genombrüchigkeit bei Nierentransplantierten ließ sich in dieser Studie folglich nicht nachweisen. Die Ergebnisse deuten vielmehr darauf hin, dass von einer weitgehend gleichen Häufigkeit von Mikrokernen in Lymphozyten, die keiner DNS-Schädigung ausgesetzt waren, bei Nierentransplantierten und Gesunden ausgegangen werden kann.
Eine von Gantenberg et al. durchgeführte Studie diente dem Vergleich der Mikrokernfrequenzen bei Patienten mit lympho- und myeloproliferativen Erkrankungen, die zytostatisch und mit Bestrahlung behandelt worden waren, und gesunden Probanden [Gantenberg et al.,

1991]. Auch hier ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Mikrokernfrequenzen in unbehandelten Lymphozyten beider Gruppen. Eine anschließende in vitro-Bestrahlung der Blutproben erbrachte bis zu einer Dosis von 3,75 Gy Dosis-Antwort-Kurven der Mikrokernfrequenzen von Gesunden und Erkrankten. Nach einer Bestrahlung mit 5 Gy ergaben sich für die Patienten sogar niedrigere Mikrokernzahlen als bei den gesunden Probanden [Gantenberg et al., 1991]. Zwar untersuchte diese Studie ein anderes Patientenkollektiv als diese Arbeit, dennoch ergeben sich insofern Parallelen, als Patienten mit myeloproliferativen Syndromen unter Zytostatikatherapie ebenfalls einer starken Immunsuppression ausgesetzt sind. Diese kommt sowohl durch die Grunderkrankung als auch durch die medikamenten- und strahlungsinduzierte Knochenmarksschädigung zustande. Aus diesem Grunde erscheint ein Vergleich beider Studien durchaus berechtigt.

Die Mikrokernhäufigkeiten in allen vier Gruppen schwankten zwischen Werten von 0 oder 1 ‰ Mikrokernen bis hin zu Mikrokernfrequenzen von 25 ‰. Dies ist jedoch nicht weiter verwunderlich, da auch in der gängigen Literatur von starken interindividuellen Schwankungen der Mikrokernfrequenz berichtet wird [Gantenberg et al., 1991; Streffer, 1997]. Sogar bei ein und demselben Individuum konnten bei wiederholter Messung über einen Zeitraum von 100 Tagen Schwankungen der Mikrokernzahlen zwischen 2,5 und 4,5 Promille beobachtet werden [Streffer, 1997].

Die Literatur berichtet von erhöhtem Auftreten strukturell abnormer Chromosomen bei urämischen Patienten, bei denen ein bis zu 7-fach erhöhtes Malignomrisiko verzeichnet werden kann [Matas et al., 1975]. So konnte im Serum urämischer Patienten eine bis zu 4,5-fach erhöhte Rate von Schwesterchromatidaustauschen gegenüber der Normalbevölkerung notiert werden. Weitere häufige strukturelle Aberrationen bestanden in Ringchromosomen und azentrischen Chromosomenfragmenten, wobei eine positive Korrelation zwischen der Häufigkeit azentrischer Fragmente und der Dauer der Urämie nachgewiesen werden konnte [Cengiz et al., 1988]. Dies ist insofern von Interesse, als sich nahezu alle nierentransplantierten Patienten mit Fortschreiten der letztlich zur Transplantation führenden Nierenerkrankung im Stadium der chronischen Niereninsuffizienz befunden hatten. Diese Erkrankungsphase lag jedoch bei den meisten Patienten Monate bis Jahre zurück. Die durchschnittlich nach der Transplantation vergangene Zeit lag bei allen 40 Patienten bei 38,5 Monaten. Durch die Überbrückung des Zeitraumes bis zur Transplantation durch Hämodialyse und durch die Transplantation selbst, wurde einer Anreicherung karzinogener Substanzen im Serum in einem Ausmaß, wie sie im Stadium des chronischen Nierenversagens auftritt, verhindert. Dies mag eine Erklärung dafür sein, dass ein Nachweis einer erhöhten Chromosomenbrüchigkeit bei Nierentransplantierten in dieser Arbeit nicht erbracht wurde. Für zukünftige Studien, die sich mit der Mikrokernhäufigkeit bei Nierentransplantierten befassen, wäre es von Bedeutung, die Gruppe der untersuchten Patienten genauer nach der Transplantationszeit, nach

Medikation und Vorerkrankung, die zur Transplantation geführt hat, zu unterteilen. Die Auswirkungen der Dauer der Hämodialyse oder der immunsuppressiven Therapie auf die Genomstabilität könnten differenzierter erfasst werden. Auch die Einflussnahme der unterschiedlichen Medikamente und ihrer Kombinationen auf die Chromosomenstabilität könnte so analysiert werden. Darüber hinaus könnten Zusammenhänge zwischen zugrundeliegender Nierenerkrankung und Neigung zur Malignomentstehung aufgedeckt werden.

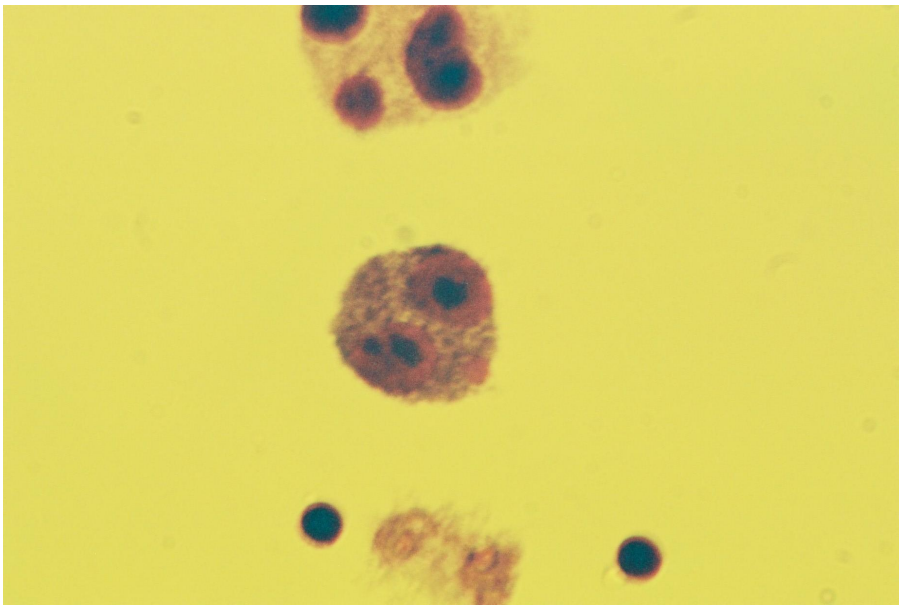


Abbildung 13: Binukleärer Lymphozyt mit Mikrokern

4.2.4 Überprüfung des Einflusses von Cyclosporin A auf die Mikrokernbildung

18 der 40 nierentransplantierten Patienten erhielten das Immunsuppressivum Cyclosporin A in Kombination mit Methylprednison und Azathioprin oder Mycophenolat Mofetil als immunsuppressive Langzeitmedikation. Dem Pilzprodukt Cyclosporin A wird in der Literatur eine nicht unbedeutende Rolle bei der Entstehung maligner Neoplasien zugeschrieben [Penn, 1987; Weinstein et al., 2000; Herman et al., 2001]. So konnte bei in vitro Studien mit menschlichen Zellen eine direkte genotoxische Wirkung von Cyclosporin A durch die Induktion des Austausches von Schwesterchromatiden nachgewiesen werden [Penn, 1987; Weinstein et al., 2000; Herman et al., 2001]. Um einen möglichen Effekt von Cyclosporin A auf die Entstehungshäufigkeit von Mikrokernen zu erfassen, wurde die Mikrokernhäufigkeit in Lymphozyten derjenigen Patienten, in deren Medikationsschema Cyclosporin A neben anderen

Medikamenten enthalten war, mit der Mikrokernanzahl bei den nierentransplantierten Patienten ohne Cyclosporintherapie verglichen. Beim statistischen Vergleich beider Patientengruppen ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied in der Mikrokernfrequenz. Ein Anhaltspunkt für die Induktion einer erhöhten Genominstabilität durch das Immunsuppressivum Cyclosporin A ergibt sich folglich aus den Ergebnissen dieser Arbeit nicht.

Bei Lymphozyten des peripheren Blutes, wie sie in dieser Studie als Zellmaterial Verwendung fanden, handelt es sich nicht um eine homogene Zellpopulation. Vielmehr setzen sich die Lymphozyten des peripheren Blutes aus mehreren Lymphozytensubpopulationen wie T-Helfer-, T-Suppressor-, zytotoxischen T-Lymphozyten und B-Lymphozyten zusammen. Gerade im Hinblick auf die Erforschung der Auswirkungen der Immunsuppression auf die Genomstabilität, ist aber eine Unterscheidung der untersuchten Lymphozyten nach Zugehörigkeit zu den einzelnen Lymphozytensubklassen von Bedeutung. Diese unterscheiden sich nicht nur in ihrer Funktion und Stimulierbarkeit durch verschiedene Substanzen, sondern auch in ihrer Empfindlichkeit gegenüber Mutagenen [Wuttke et al., 1993]. So konnte bei B-Lymphozyten eine größere Empfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlung als bei den anderen Lymphozytensubpopulationen beobachtet werden. Diese äußerte sich in einer höheren Mikrokernfrequenz bei B-Lymphozyten als bei den anderen Lymphozytensubpopulationen [Wuttke et al., 1993]. Auch durch immunsuppressive Medikamente sind die einzelnen Lymphozytensubgruppen unterschiedlich in ihrer Funktion und Anzahl betroffen. Um die Auswirkungen der einzelnen Medikamentengruppen auf molekularer Ebene erfassen zu können, wäre es daher bei der Durchführung des Mikrokerntests an Lymphozyten Immunsupprimierter von Interesse, zwischen verschiedenen Lymphozytensubgruppen zu unterscheiden. Eine Markierung mit spezifischen Lymphozytenantikörpern bei der Durchführung des Mikrokerntests würde dies ermöglichen.

4.3 Comet Assay und Mikrokerntest in gemeinsamer Anwendung

Der Comet Assay und der Mikrokerntest wurden in dieser Arbeit gemeinsam angewendet, da es sich hierbei um erprobte Verfahren handelt, für die Lymphozyten als zu untersuchendes Zellmaterial gut geeignet sind. Die dazu benötigten Zellzahlen sind zudem relativ gering, was besonders bei der Verwendung von Blutproben immunsupprimierter nierentransplantierter Patienten von Bedeutung war.

Die Eignung beider Testverfahren in kombinierter Anwendung zur Erfassung einer genetischen Prädisposition für erhöhte Strahlenempfindlichkeit, die sich sowohl in einem Defizit der DNS-Reparaturfähigkeit als auch in einer Fehlregulation des Zellzyklus äußert, wurde bereits

erfolgreich erprobt [Streffer, 1997]. Auch der Vergleich beider Testverfahren an gesunden Probanden ergab eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse beider Verfahren [Diem und Rüdiger, 1999].
Aus diesem Grunde wurden beide Verfahren auch in dieser Arbeit bei der Suche nach genetischen Veränderungen bei Nierentransplantierten unter Langzeitimmunsuppression in Kombination verwendet. Dies ermöglichte sowohl eine Erfassung der DNS-Sensitivität gegenüber mutagenen Substanzen und der Aktivität und Effektivität der DNS-Reparaturmechanismen als auch eine Überprüfung der Stabilität des Genoms dieses Patientenkollektivs. Die Inzidenz von Mikrokernen wird nachweisbar von DNS-Reparaturvorgängen beeinflusst. So ließ sich zeigen, dass DNS-Schäden in Lymphozyten, die normalerweise durch Exzisionsreparaturmechanismen behoben werden, sich innerhalb eines Zellzyklus durch Zugabe von Inhibitoren der Reparaturenzyme in Mikrokerne umwandeln [Fenech und Neville, 1992].

4.4 Korrelation der DNS-Migration und der Mikrokernbildung

Von Interesse war im Rahmen dieser Studie auch die Frage nach einem nachweisbaren Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Schädigung in den Lymphozytenreparaturversuchen und der Mikrokernfrequenz. Eine positive Korrelation zwischen einer erhöhten Mutagensensitivität und herabgesetzten Reparaturkapazität sowie einer erhöhten Genominstabilität ist wahrscheinlich. Der Nachweis einer hochsignifikanten Korrelation der Mikrokernfrequenz in Lymphozyten, die nicht mit einem Fremstoff inkubiert oder bestrahlt worden waren, mit Ergebnissen des Comet Assays wurde bereits erbracht [Diem und Rüdiger, 1999]. Um solche Zusammenhänge auch in dieser Studie aufzudecken, wurde für jeden Studienteilnehmer mit im Rahmen ein und derselben Blutentnahme gewonnenen und eingefrorenen Lymphozytenproben sowohl ein Lymphozytenreparaturversuch als auch ein Mikrokerntest durchgeführt.
Ein Vergleich der Mikrokernhäufigkeiten mit den DNS-Migrationen für die Kontrolle mit Aqua bidest. wurde bei nierentransplantierten Patienten und Kontrollpersonen durchgeführt. Erfasst wurden so die DNS-Migrationen bei nur mit der Kontrollsubstanz behandelten Lymphozyten, also ohne Zusatz von NDEA. Die Korrelationsanalyse ergab jedoch keine signifikante Korrelation.
Mögliche Gründe hierfür werden jedoch beim Vergleich von Mikrokerntest und Comet Assay bezüglich ihrer Gemeinsamkeiten und Unterschiede offenkundig. Der Comet Assay ist eine sensitive Methode, mit deren Hilfe Einzelstrangbrüche und alkalilabile Stellen in der DNS nicht-proliferierender Einzelzellen aufgedeckt werden können [Diem und Rüdiger, 1999]. Er

eignet sich, um quantitative Schäden an der Erbinformation zu untersuchen, die durch die Einwirkung bestimmter mutagener Substanzen oder ionisierender Strahlung entstanden sind. Eine Lokalisation des Ortes der Schädigung in der DNS erlaubt er in einfacher Anwendung jedoch nicht. Daneben ermöglicht der Comet Assay eine Untersuchung der Reparaturkinetik geschädigter DNS während eines Beobachtungszeitraumes [Singh et al., 1991]. Diese Anwendung fand der Comet Assay auch in der vorliegenden Arbeit: Zum einen wurde die Mutagensensitivität der DNS in Lymphozyten Nierentransplantierter gegenüber der Substanz NDEA untersucht, die sich in einer Zunahme von DNS-Strangbrüchen äußerte. Zum anderen wurde die Effektivität der DNS-Reparaturvorgänge, die zur Behebung dieser Schäden führen, über einen Zeitraum von 60 Minuten beobachtet.

Im Mikrokerntest werden anders als im Comet Assay proliferierende Zellen untersucht. Dabei deckt der Mikrokerntest größere strukturelle Veränderungen der Chromosomen auf [Lasne et al., 1984]. Die Entstehung von Mikrokernen liegt in einer fehlerhaft verlaufenden Karyokinese, Kernteilung, bei regelrecht erfolgter Zytokinese, Zytoplasmateilung, begründet. Dabei werden entweder azentrische Chromosomenfragmente, ganze Chromatiden oder sogar vollständige Chromosomen nicht in einen der beiden neu entstehenden Tochterkerne aufgenommen. Stattdessen erscheinen sie nach abgelaufener Mitose als Chromatinpartikel im Zytoplasma einer der beiden Tochterzellen.

Mikrokerne können einerseits durch Brüche im Bereich der Chromosomen entstehen. Diese haben ihre Ursache in einer individuellen genetisch bedingten Instabilität durch einen erblichen Defizit der DNS-Reparaturmechanismen [Hsu, 1987] oder rühren von der Einwirkung mutagener Substanzen oder ionisierender Strahlung her [Gantenberg et al., 1991; Streffer, 1997]. Derartige Mikrokerne enthalten azentrische Chromosomenfragmente und entstehen meist während der Anaphase einer mitotischen Teilung [Degrassi und Tanzarella, 1988].

Daneben können Mikrokerne aber auch durch eine entweder genetisch bedingte oder durch Substanzen wie Colchicin ausgelöste Fehlfunktion des Spindelapparates zustande kommen. Auf solche Art entstandene Mikrokerne enthalten zumeist ganze Chromosomen und entstehen in der Metaphase einer mitotischen Zellteilung [Degrassi und Tanzarella, 1988]. Die Folge für eine der beiden Tochterzellen bei der Bildung solcher Mikrokerne während einer Mitose ist ein aneuploider Chromosomensatz.

Der Mikrokerntest kann somit Störungen in der Verteilung der Chromosomen während einer mitotischen Zellteilung aufdecken, die Art der zugrundeliegenden Kernstörung kann jedoch nicht identifiziert werden [Schmid, 1975].

Auch bei der Untersuchung der Mikrokernfrequenz in dieser Arbeit kann keine Aussage darüber gemacht werden, auf welche Weise die Mikrokerne entstanden sind: ob durch Brüche in den Chromosomen oder durch Fehlfunktion des Spindelapparates.

Genauere Angaben über die Entstehung von Mikrokernen ermöglichen erst Zusatzuntersuchungen wie Immunfluoreszenzfärbung von Kinetochoren in Mikrokernen mittels markierter Antikörper [Degrassi und Tanzarella, 1988] oder die Messung der Größe [Yamamoto und Kikuchi, 1980] und des DNS-Gehaltes der Mirkokerne [Pincu et al., 1985].
Dies zeigt, dass beide Verfahren zumindest zum Teil verschiedene Angriffspunkte im Zellorganismus haben und nur partiell gemeinsame Funktionen überprüfen.

4.5 Erklärungsmodelle

In dieser Studie konnte kein Nachweis einer erhöhten Mutagensensitivität und reduzierten DNS-Reparaturkapazität bei Nierentransplantierten erbracht werden, auch eine erhöhte Genominstabilität wurde im Vergleich mit der gesunden Kontrollgruppe nicht beobachtet. Begründungen der erhöhten Malignominzidenz bei Nierentransplantierten werden durch die Ergebnisse dieser Arbeit nicht geliefert. In der Literatur werden mehrere Hypothesen über die Ursachen des erhöhten Krebsrisikos bei chronisch immunsupprimierten Organtransplantierten diskutiert [Penn, 1988b]. Auf jeden Fall muss von einer komplexen Interaktion mehrerer Faktoren, die letztendlich zur Karzinomentstehung führt, ausgegangen werden.

4.5.1 Die durch die immunsuppressive Therapie bedingte Abwehrschwächung gegenüber entarteten Zellen

Die medikamentös induzierte chronische Immunsuppression führt nicht nur zu einer verminderten Infektabwehr des Organismus, sondern auch zu einer verschlechterten Abwehr und Vernichtung der auch unter Normalbedingungen immer wieder durch die Einwirkung von Karzinogenen und Kokarzinogenen entstehenden entarteten Zellen. Die hierbei beteiligten T-Helferlymphozyten und zytotoxischen Lymphozyten sind durch die Medikamentenwirkung sowohl in ihrer Zahl als auch in ihrer Migrationsfähigkeit und Funktion eingeschränkt [Penn, 1988b]. Neu entstandene maligne Zellen können somit nicht mehr ausreichend eliminiert werden.

4.5.2 Chronische Antigenstimulation

Durch das Transplantat selbst, durch die wiederholten Bluttransfusionen, die häufige Gabe von Blutprodukten und die daraus wie auch durch die Immunsuppression resultierenden zahlreichen Infektionen, kommt es im Organismus zu einer chronischen Antigenstimulation. Diese löst letztlich eine Überstimulation des Immunsystems aus. Die in einem gesunden Organismus intakten Feedback-Regulationsmechanismen funktionieren nicht mehr ausreichend, wodurch es zu einer verringerten Kontrolle über das Ausmaß von Immunreaktionen und zu einer überschießenden Lymphozytenproliferation kommt [Hanto et al., 1981; Penn,1988b]. Diese birgt durch die vermehrte Entstehung entarteter Klone von B- und T-Lymphozyten ein erhöhtes Risiko für die Lymphomentstehung [Hanto et al., 1981]. Daraus erklärt sich mitunter die häufige Inzidenz von lymphoproliferativen Erkrankungen wie Non-Hodgkin-Lymphomen bei Immunsupprimierten [Hanto et al., 1981; Penn, 1988b]. Dieser generelle Regulationsverlust bedingt eine weitere Schwächung der Abwehrfunktionen des ohnehin supprimierten Immunsystems und ermöglicht so die Entstehung weiterer Malignomarten [Penn, 1988b].

4.5.3 Die Rolle onkogener Viren

Die herabgesetzte Abwehrfunktion gegenüber Infektionserregern und die vermehrte Exposition gegenüber Blut und Blutprodukten begünstigt eine Neuinfektion mit oder eine Reaktivierung von bereits im Körper befindlichen onkogenen Viren. Dazu zählen das Epstein-Barr-Virus (EBV), das Herpes simplex-Virus (HSV), das Humane Papillomavirus (HPV), das Hepatitis-B- und C-Virus, oder das HI-Virus.

Gerade das EBV-Virus wird für die erhöhte Entstehung lymphoproliferativer Erkrankungen, die ihren Ausgang von B-Lymphozyten nehmen, bei Nierentransplantierten verantwortlich gemacht [Hanto et al., 1983; Hoshida et al., 1997]. Ein Zusammenhang zwischen der Häufung maligner Lymphome und einer Infektion mit EBV wird vermutet. Dabei wird ein fließender Übergang von lymphozytärer Hyperplasie bzw. benignen Lymphomen mit polyklonaler Lymphozytenvermehrung zu malignen Lymphomen durch die unkontrollierte monoklonale Vermehrung einer entarteten Zelle angenommen [Hanto et al., 1983]. Die Rolle des Epstein-Barr-Virus (EBV) bei der Entstehung von Karzinomen des Magen-Darmtraktes unter Langzeitimmunsuppression konnte in zahlreichen Studien nachgewiesen werden [; Suzuki et al., 1993].

Das Hepatitis B und C Virus ist an der Entstehung von hepatozellulären Karzinomen bei gesunden Personen wie auch bei nierentransplantierten Patienten beteiligt.

Die Mitbeteiligung der Typen 16 und 18 des Humanen Papillomavirus bei der Entstehung von Karzinomen des Genitoanalbereichs ist auch bei nierentransplantierten Patienten von Bedeutung [zur Hausen, 1989]. Hier spielen diese Subtypen sowohl bei der Genese dieser bekannten Karzinomformen wie auch bei der von Karzinomen des Übergangepithels im Urogenitaltrakt eine erhebliche Rolle [Noel et al., 1994]. Daneben konnte auch die Anwesenheit verschiedener Subtypen des Humanen Papillomavirus in Plattenepithelkarzinomen des Hals-Nasen- und Ohrenbereichs nierentransplantierter Patienten in histologischen Untersuchungen nachgewiesen werden [Bradford et al., 1990].
Eine Assoziation des Kaposi-Sarkoms mit einer Infektion mit dem Humanen Herpesvirus 8, die unter Immunsuppression häufig nachweisbar ist, wird in der Literatur ebenfalls allgemein angenommen [Alkan et al., 1997].

4.5.4 Die direkte DNS-Schädigung durch Medikamente und Umweltfaktoren

Darüberhinaus darf auch die direkte DNS-Schädigung durch Medikamente wie beispielsweise Alkylantien, die zur Entstehung von Leukämien und Blasenkarzinomen führen können, nicht vergessen werden. Die karzinogene Wirkung von UV-Licht und Viren kann zudem durch derartige Medikamente verstärkt werden, was das vermehrte Auftreten von Lichtdermatosen und Malignomen der Haut erklärt [Bouwes Bavinck et al., 1996; Bouwes Bavinck et al., 1995]. Auch auf die Rolle des Antimetaboliten Azathioprin und seines Metaboliten 6-Mercaptopurin bei der Entstehung von Plattenepithelkarzinomen muss in diesem Zusammenhang hingewiesen werden. Azathioprin ist das Derivat von 6-Mercaptopurin und wird als Immunsuppressivum zur Prävention von Transplantatabstoßungsreaktionen eingesetzt. Der Wirkmechanismus von Azathioprin, wie auch der von 6-Mercatopurin, besteht in der Hemmung der de novo Purinsynthese. Beide Substanzen blockieren das Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase, indem sie, bedingt durch ihre Strukturähnlichkeit mit natürlich vorkommenden Substraten, als Antimetaboliten dieser Substanzen an das Enzym binden. Das Resultat ist eine Störung der Purin- und damit der DNS- und RNS-Synthese. Azathioprin und 6-Mercaptopurin zeigen über diesen Mechanismus hemmende Effekte auf die einzelnen, bei der Immunantwort beteiligten Lymphozytensubpopulationen wie B- und T-Zellen sowie Natürliche Killerzellen. Insbesondere der Metabolit 6-Mercaptopurin spielt eine Rolle bei der Entstehung von Plattenepithelkarzinomen von Haut und Schleimhäuten [Taylor und Shuster, 1992; Glover et al., 1994; Bottomley et al., 1995].

4.6 Ausblicke

Die Malignomentstehung unter chronischer Immunsuppression ist eine komplexe Thematik, bei deren Erforschung von einer Interaktion zahlreicher, zum Teil unbekannter Faktoren ausgegangen werden muss. Dies belegen auch die oben dargestellten, unterschiedlichen Erklärungsmodelle anderer Untersucher. Experimentelle Studien ermöglichen es, mit Hilfe bestimmter etablierter Verfahren, Einblicke in die möglicherweise beteiligten Mechanismen zu erhalten und diese zu analysieren. Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der DNS-Mutagensensitivität und Reparaturkapazität sowie mit der Genomstabilität in Lymphozyten nierentransplantierter Patienten anhand zweier erprobter quantitativer Verfahren, dem Comet Assay und dem Mikrokerntest. Den mit diesen Methoden gewonnenen Ergebnissen zufolge kann nicht von einer dem Normalkollektiv gegenüber erhöhten Einschränkung der DNS-Reparatur oder von einer vermehrten Empfindlichkeit und Instabilität des Genoms Nierentransplantierter ausgegangen werden. Dies sind wichtige Anhaltspunkte für die weitere Ursachenforschung.

Gerade der Comet Assay als etabliertes Verfahren bietet Möglichkeiten zu weiteren Modifikationen, die genauere Rückschlüsse auf die Reparaturmechanismen der DNS erlauben, so zum Beispiel in Kombination mit der Flureszenz-in-situ-Hybridisierung zur Markierung verschiedener Chromosomen. Somit wären auch qualitative Aussagen über Mutagensensitivität und Reparaturkapazität möglich und eventuelle Prädilektionsstellen des Genoms könnten aufgedeckt werden. Die Entwicklung der Kombination beider Verfahren steht jedoch noch am Anfang.

Eine Modifikation des Mikrokerntests, beispielsweise durch Markierung einzelner Lymphozytensubpopulationen mittels spezifischer Antikörper gegen Lymphozytenmarker, könnte bei der Analyse der immunsuppressiven Medikamentenwirkung von Interesse sein. Die Auswirkungen bestimmter Substanzklassen auf die Genomstabilität und damit auch auf die Reparaturkapazität der einzelnen Lymphozytenklassen könnten somit genauer erforscht werden.

Allerdings liefert jede Studie nur Einblicke in einen Ausschnitt der komplexen Thematik, die von vielen anderen Faktoren mitbestimmt wird, welche mit einer Methode allein nicht zu erfassen sind. Erst die Ergebnisse zahlreicher weiterer Forschungen mit verschiedenen Methoden wie auch die Durchführung klinischer Langzeitstudien auf diesem Gebiet werden es ermöglichen, in ihrer Gesamtheit ein Bild von den an der Karzinogenese beteiligten Mechanismen zu entwerfen.

Für die Organtransplantation ist es wichtig, der erhöhten Malignominzidenz als einer ihrer gravierendsten Nebenwirkungen, die notwendige Aufmerksamkeit zukommen zu lassen. Die umfassende Auseinandersetzung mit dieser Problematik wird auch weiterhin Aufgabe der Forschung sein.

5. Zusammenfassung

Die Transplantation gesunder Organe, insbesondere der Nieren, zur Therapie unheilbarer Erkrankungen stellt eine der bedeutendsten Errungenschaften der modernen Medizin dar. Die zur Vermeidung der Organabstoßung erforderliche langzeitige Immunsuppression beinhaltet jedoch auch ein gegenüber der Normalbevölkerung erhöhtes Risiko für die Entstehung maligner Erkrankungen, so vor allem von Plattenepithelkarzinomen der Haut und malignen Lymphomen. Auffällig ist weiterhin auch die vermehrte Aggressivität dieser Malignomerkrankungen, die sich in rascher Progredienz und Metastasierung und damit verbundener erhöhter Letalität äußert. Als mögliche Ursache dieser Phänomene kommen eine erhöhte Mutagensensitivität der DNS, wie auch eine reduzierte Reparaturkapazität der DNS-Reparaturmechanismen durch die chronische Behandlung mit immunsuppressiven Medikamenten in Betracht.

Ziel dieser Arbeit sollte es daher sein, anhand der etablierten Verfahren Comet Assay und Mikrokerntest, Aussagen über die Reparaturkapazität und die Genomstabilität bei nierentransplantierten Patienten zu ermöglichen.

Untersucht wurde ein Kollektiv von 40 nierentransplantierten Patienten, darunter 21 Männer und 19 Frauen, denen ein Kontrollkollektiv von ebenfalls 21 Männern und 19 Frauen zum Vergleich gegenübergestellt wurde. Als zu untersuchendes Zellmaterial dienten Lymphozyten des peripheren Blutes.

Der Comet Assay wurde als quantitatives Verfahren zur Bestimmung fremdstoffinduzierter DNS-Schäden an einzelnen, nicht proliferierenden Zellen eingesetzt. Die Untersuchung von DNS-Reparaturereignissen über einen definierten Zeitraum wurde hierdurch ermöglicht. Nach Induktion eines DNS-Schadens durch Zugabe eines mutagenen Agens wurden über einen Zeitraum von 60 Minuten Reparaturereignisse an der DNS von Lymphozyten quantitativ erfasst.

Der Mikrokerntest wurde als quantitatives Verfahren zur Untersuchung erhöhter Genominstabilität sowohl aufgrund individueller Disposition als auch als Folge der Einwirkung mutagener Substanzen verwendet. Eine erhöhte Genominstabilität, wie sie in der Bildung von

Mikrokernen zum Ausdruck kommt, kann ihre Ursache sowohl in einer erhöhten Mutagensensitivität als auch in einem Defizit der DNS-Reparaturmechanismen haben.
In der vorliegenden Arbeit wurde der Mikrokerntest an unbehandelten Lymphozyten der Patienten- und der Kontrollgruppe durchgeführt, um Aussagen über die spontane Brüchigkeit des Genoms in beiden Gruppen zu erlauben.

Die Ergebnisse der mit der Methode des Comet Assays durchgeführten Lymphozytenreparaturversuche zeigten bei Nierentransplantierten weder eine erhöhte Sensitivität gegenüber Mutagenen noch eine dem Normalkollektiv gegenüber reduzierte DNS-Reparaturkapazität. Vielmehr wurden beim Vergleich der Mediane der DNS-Migrationen mitunter signifikant verminderte Reparaturaktivitäten der Lymphozyten-DNS des Kontrollkollektivs beobachtet. Beim Vergleich der Mittelwerte dagegen ergab sich zu den meisten Versuchszeitpunkten kein signifikanter Unterschied zwischen Nierentransplantierten und Kontrollpersonen.
Bei der Durchführung des Mikrokerntests wurden bei Nierentransplantierten wie auch bei Kontrollpersonen keine signifikanten Unterschiede der Mikrokernfrequenzen verzeichnet. Bei den weiblichen Studienteilnehmern fanden sich insgesamt signifikant höhere Mikrokernraten als bei den männlichen, unabhängig davon, ob diese zum Patienten- oder Kontrollkollektiv gehörten.

Somit konnte die Hypothese, dass bei Nierentransplantierten mit einer erhöhten Sensitivität der DNS gegenüber schädigenden Substanzen oder mit einer Reduktion der DNS-Reparaturfähigkeit zu rechnen sei, durch die Ergebnisse dieser Studie nicht gestützt werden. Da es sich bei der Karzinogenese jedoch um einen komplexen Prozess handelt, bei dem zahlreiche Faktoren beteiligt sind, kommt auch in Zukunft der Forschung nach möglichen Ursachen große Bedeutung zu. Nur durch Kenntnis der beteiligten Mechanismen und durch die Einschränkung der damit verbundenen Risiken ist ein verbessertes Langzeitüberleben organtransplantierter Patienten möglich.

6. Anhang

6.1 Literatur

Ahlers, C., Kreideweiss, S., Nordheim, A. und Rühlmann, A., "Cyclosporin A inhibits Calcium-mediated upregulation of the DNA repair enzyme DNA polymerase beta in human blood mononuclear cells," *European Journal of Biochemistry*, 1999, 952-959.

Alkan, S., Karcher, D.S., Ortiz, A., Khalil, S., Akhtar, M. und Ashraf Ali, M., "Human herpesvirus-8/Kaposi´s sarcoma-associated herpesvirus in organ transplant patients with immunosuppression," *British Journal of Haematology*, 1997, 412-414.

Almirall, J., "Renal cell carcinoma and acquired cystic renal disease after renal transplantation," *Transplantation international*, 1990, 49.

Auerbach, A.D. und Allen, R.G., "Leukemia and preleukemia in Fanconi Anemia patients," *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 1991, 1-12.

Bottomley, W.W., Ford, G., Cunliffe, W.J. und Cotterill, J.A., "Aggressive squamous cell carcinoma developing in patients receiving long-term azathioprine," *British Journal of Dermatology*, 1995, 460-462.

Bouwes Bavinck, J. N., Hardie, D. R., Green, A., Cutmore, S., McNaught, A., O´Sullivan, B., Siskind, V., van der Woude, F.J. und Hardie, I.R., "The risk of skin cancer in renal transplant recipients in Queensland, Australia," *Transplantation*, 1996, 715-721.

Bouwes Bavinck, J.N., Robertson, I., Wainwright, R.W. und Green, A., "Excessive numbers of skin cancers and pre-malignant skin lesions in an Australian heart transplant recipient," *British Heart Journal* , 1995, 468-470.

Bradford, C. R., Hoffman, H. T., Wolf, G.T., Carey, T.E., Baker, S.R. und McClatchey, K.D., "Squamous carcinoma of the head and neck in organ transplant recipients: possible role of oncogenic viruses," *Laryngoscope*, 1990, 190-199.

Brown-Peterson, N., Krol, R. M., Zhu, Y. und Hawkins, W. E., "N-Nitrosodiethylamine initiation of carcinogenesis in Japanese Medaka (Oryzias latipes): hepatocellular proliferation, toxicity, and neoplasitc lesions resulting form short term , low level exposure," *Toxicological Sciences*, 1999, 186-194.

Cengiz, K., Block, A. W., Hossfeld, D. K., Anthone, R., Anthone, S. und Sandberg, A. A., "Sister chromatid exchange and chromosome abnormalities in uremic patients," *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 1988, 55-67.

Cuckovic, C., Djukanovic, L., Jankovic, S., Stanojcic, A., Dragicevic, P., Radmilovic, A., Lambic, L., Stojanovic, M., Milic, M., Bakovic, J., Radovic, M. und Labudovic, M., "Malignant tumors in hemodialysis patients," *Nephron*, 1996, 710-712.

Degrassi, F. und Tanzarella, C., "Immunofluorescent staining of kinetochores in micronuclei: a new assay for the detection of aneuploidy," *Mutation Research*, 1988, 339-345.

Diem, E. und Rüdiger, H.W., "Mikrokerntest und Comet Assay: Ein Ergebnisvergleich bei Normalprobanden?," *Arbeitsmedizin, Sozialmedizin, Umweltmedizin*, 1999, 437-441.

Fenech, M. und Morley, A., "A measurement of micronuclei in lymphocytes," *Mutation Research*, 1985, 29-36.

Fenech, M. und Morley, A., "Solutions for the kinetic problem in the Micronucleus assay," *Cytobios*, 1985, 233-246.

Fenech, M. und Neville, S., "Conversion of excision-repairable DNA lesions to micronuclei within one cell cycle in human lymphocytes," *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 1992, 27-36.

Friedman, J., Levi, J., Malachi, T. und Slor, H., "Pronounced depressed ability of DNA repair in uremic human lymphocytes," *Transplantation*, 1988, 665-666.

Gafter, U., Malachi, T., Ori, Y. und Breibart, H., "The role of calcium in human lymphocyte DNA repair aibility," *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 1997, 33-41.

Gantenberg, H.-W., Wuttke, K., Streffer, C. und Müller, W.-U., "Micronuclei in human lymphocytes irradiated in vitro or in vivo," *Radiation Research*, 1991, 276-281.

Glover, M.T., Niranjan, N., Kwan, J.T. und Leigh, I.M., "Non-melanoma skin cancer in renal transplant recipients: the extent of the problem and a strategy for management," *British Journal of Plastic Surgery*, 1994, 86-89.

Hanto, D.W., Frizzera, G., Purtilo, D.T., Sakamoto, K., Sullivan, J., Saemundsen, A.K., Klein, G., Simmons, R.L. und Narajan, J.S., "Clinical spectrum of lymphoproliferative disorders in renal transplant recipients and evidence for the role of Epstein-Barr Virus," *Cancer Research*, 1981, 4253-4261.

Hanto, D.W., Gajl-Peczalska, K.J., Frizzera, G., Arthur, D.C., Balfour, H.H., McClain, K., Simmons, R.L. und Najarian, J.S., "Epstein-Barr Virus (EBV) induced polyclonal and monoclonal B-cell lymphoproliferative diseases occurring after renal transplantation," *Annuals of surgery*, 1983, 356-368.

Herman, M., Weinstein, T., Korzets, A., Chagnac, A., Ori, Y., Zevin, D., Malachi, T. und Gafter, U., "Effect of cyclosporin A on DNA repair and cancer incidence in kidney transplant recipients," *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* , 2001, 14-20.

Hojo, M., Morimoto, T., Malucci, U., Asano, T., Morimoto, K. und Lagman, M., "Cyclosporin A induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism," *Nature*, 1999, 30-34.

Hoover, R. und Fraumeni, J.F., "Risk of cancer in renal transplant recipients," *The Lancet*, 1973, 55-57.

Hoshida, ., Tomita, Y., Ohsawa, M., Ning, X. und Aozasa, K., "Epstein-Barr virus in malignancies in renal transplant recipients in Japan," *Journal of Cancer Research Clinical Oncology*, 1997, 509-513.

Hsu, T.C., "Genetic predisposition to cancer with special reference to mutagen sensitivity," *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 1987, 591-603.

Kanitakis, J., Euvrard, S., Lefrancois, N., Hermier, C. und Thivolet, J., "Oral hairy leukoplakia in a HIV-negative renal graft recipient," *British Journal of Dermatology*, 1991, 483-486.

Katai, M., Sakurai, A., Ichikawa, K., Katakura, M., Nishii, Y., Okaneya, T., Kaneko, G., Nakazawa, K., Shigematsu, H., Shinoda, T. und Hashizume, K., "Sarcomatoid renal cell carcinoma with widespread metastases to liver and bones in a kidney transplant recipient," *Transplantation* , 1997, 1361-1363.

Kinlen, L.J., Sheil, A.G.R., Peto, J. und Doll, R., "Collaborative United Kingdom-Australasian study of cancer in patients treated with immunosuppressive drugs," *British Medical Journal*, 1979, 1461-1466.

Kliem, V., Thon, W., Krautzig, S., Kolditz, M., Behrendt, M., Pichlmayr, R., Koch, K.M., Frei, U. und Brunkhorst, R., "High mortality from urothelial carcinoma despite regular tumor screening in patients with analgesic nephropathy after renal transplantation," *Transplantation International*, 1996, 231-325.

Kuchenmeister, F., "Die Einzelzellmikrogelelektrophorese: eine schnelle und sensitive Methode zum Nachweis von DNA-Schäden in Einzelzellen.," *Diplomarbeit, vorgelegt der Fakultät für Biologie der Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg*, 1991, .

Lasne, C., Gu, Z.W., Venegas, W. und Chouroulinkov, I., "The in vitro micronucleus assay for detection of cytogenetic effects induced by mutagen-carcinogens: comparison with the in vitro sister chromatid exchange assay," *Mutation Research*, 1984, 273-282.

Lewis, D. F. V., Brantom, P. G., Ioannides, C., Walker, R. und Parke, D. V., "Nitrosamine carcinogenesis: rodent assays, quantitative structure-activity relationships, and human risk assessment," *Drug Metabolism Reviews*, 1997, 1055-1078.

Maisonneuve, P., Agoda, L., Gellert, R., Stewart, J.H., Buccianti, G., Lowenfels, A.B., Wolfe, R.A., Jones, E., Disney, A.P.S., Briggs, D., McCredie, M. und Boyle, P., "Cancer in patients on dialysis for end-stage renal disease: an international collaborative study," *The Lancet*, 1999, 93-98.

Malachi, T., Zevin, D., Gafter, U., Chagnac, A., Slor, H. und Levi, J., "DNA repair and recovery of RNA synthesis in uremic patients," *Kidney International*, 1993, 385-389.

Matas, A. J., Simmons, R. L., Kjellstrand, C. M., Buselmeier, Th. J. und Najarian, J. S., "Increased incidence of malignancy during chronic renal failure," *The Lancet* , 1975, 883-886.

McKelvey-Martin, V.J., Green, M.H.L., Schmezer, P., Pool-Zobel, B.L., De Meo, M.P. und Collins, A., "The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review," *Mutation Research*, 1993, 47-63.

Noel, J.C., Peny M.O.; Mat, , Mat, O., Antoine, M., Firket, C., Detremmerie, O., Thiry, L., Verhest, Al und Vereerstraeten, P., "Human papillomavirus type 16 associated with multifocal transitional cell carcinomas of the bladder in two transplanted patients," *Transplantation International*, 1994, 340-343.

Östling, O. und Johanson, K.J., "Microgelelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1984, 291-298.

Olive, P., Banath, J.P. und Durand, R.E., "Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay," *Radiation Research* , 1990, 86-94.

Olive, P.L., Wlodek, D. und Banath, J.P., "DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis," *Cancer Research*, 1991, 4671-4676.

Pecqueux, J.C., Schwarz, A., Dieckmann, K.P. und Offermann, G., "Cancer Incidence in Patients on chronic dialyses and in renal transplant recipients," *Urology International*, 1990, 290-292.

Penn, I., "Cancers after cyclosporine therapy," *Transplantation Proceedings*, 1988, 276-279.

Penn, I., "Cancers complicating organ transplantation," *New England Journal of Medicine* , 1990, 1767-1769.

Penn, I., "Cancers following cyclosporine therapy," *Transplantation Proceedings*, 1987, 2211-2213.

Penn, I., "Incidence and treatment of neoplasia after transplantation," *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 1993, 328-335.

Penn, I., "Malignant lymphomas in transplantation patients," *Transplantation Proceedings*, 1969, 106-111.

Penn, I., "Primary kidney tumors before and after renal transplantation," *Transplantation*, 1995, 480-485.

Penn, I., "The changing pattern of posttransplant malignancies," *Transplantation Proceedings*, 1991, 1101-1103.

Penn, I., "Tumor Incidence in human allograft recipients," *Transplantation proceedings*, 1979, 1047-1051.

Penn, I., "Tumors of the immunocompromised patient," *Annual Review of Medicine*, 1988, 63-73. (b)

Pincu, M., Callisen, H. und Norman, A., "DNA content of micronuclei in human lymphocytes," *International Journal of Radiation and Biology*, 1985, 423-432.

Schmid, W., "The micronucleus test," *Mutation Research*, 1975, 9-15.

Schmähl, D. und Habs, M., "Carcinogenicity of N-nitroso compounds," *Oncology*, 1980, 237-242.

Setlow, R.B., "Repair deficient human disorders and cancer," 1984, 1199-1204.

Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R. und Schneider, E. L., "A simple technique for quantitation of low levels of DNA-damage in individual cells," *Experimental Cell Research*, 1988, 184-191.

Singh, N. P., Tice, R. R., Stephens, R. E. und Schneider, E. L., "A microgel electrophoresis technique for the direct quantitation of DNA damage and repair in individual fibroblasts cultured on microscope slides," *Mutation Research*, 1991, 289-296.

Stopper, H., Meysen, T., Böckenförde, A., Bahner, U., Heidland, A. und Vamvakas, S., "Increased genomic damage in lymphocytes of patients before and after long-term maintenance hemodialysis therapy," *American Journal of Kidney Diseases*, 1999, 433-437.

Streffer, C., "Genetische Prädisposition und Strahlenempfindlichkeit bei normalen Geweben," *Strahlentherapie und Onkologie*, 1997, 462-468.

Suzuki, T., Takano, Y., Yamashita, K., Sato, K., Kakita, A. und Okudaira, M., "A possible role of EBV in tumorigenesis after immunosuppression in cases of renal transplantation," *Journal of Cancer Research in Clinical Oncology*, 1993, 627-629.

Taylor, A.E.M. und Shuster, S., "Skin cancer after renal transplantation: the causal role of azathioprine," *Acta Dermatologica et Venereologica (Stockh)*, 1992, 115-119.

Thiel, C., Bock, A., Spöndlin, M., Brunner, F.P., Mihatsch, M., Rufli, T. und Landmann, J., "Long-term benefits and risks of Cyclosporin A (Sandimmun)- an analysis at 10 years," *Transplantation Proceedings*, 1994, 2493-2498.

Vamvakas, S., Bahner, U., Becker, P., Steinle, A., Götz, R. und Heidland, A., "Impairment of DNA repair in the course of long-term hemodialysis and under cyclosporine immunosuppression after renal transplantation," *Transplantation Proceedings*, 1996, 3468-3473.

Vilardell, J., Oppenheimer, F., Talbot-Wright, R., Ricart, M.J., Andreu, J., Alcaraz, A. und Carretero, P., "Increased risk of malignant tumors in renal transplant recipients receiving cyclosporin," *Transplantation Proceedings* , 1992, 1948.

Volgger, B., Marth, C., Zeimet, A., Müller-Holzner, E., Ruth, N. und Dapunt, O., "Fulminant course of a microinvasive vulvar carcinoma in an immunosuppressed woman," *Gynecology Oncology*, 1997, 177-179.

Weinstein, T., Korzets, A., Chagnac, A., Ori, Y., Herman, M., Zevin, D., Malachi, T. und Gafter, U., "Effect of immunosuppressive therapy on DNA repair and cancer incidence in renal transplant recipients," *Transplantation Proceedings*, 2000, 694-695.

Weirich-Schweiger, H., Weirich, H. G., Gruber, B., Schweiger, M. und Hirsch-Kaufmann, M., "Correlation between senescence and DNA-repair in cells from young and old individuals and in premature aging syndromes," *Mutation Research*, 1994, 37-48.

Wuttke, K., Streffer, C. und Müller, W.-U., "Radiation induced micronuclei in subpopulations of human lymphocytes," *Mutation Research*, 1993, 181-188.

Yamamoto, K.I. und Kikuchi, Y., "A comparison of diameter of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons," *Mutation Research*, 1980, 127-131.

zur Hausen, H., "Papillomaviruses in anogenital cancer as a model to understand the role of viruses in human cancers," *Cancer Research*, 1989, 4677-4681.

6.2 Tabellen

Tabelle 1a: Vorerkrankungen, Transplantations- und Hämodialysezeit der männlichen nierentransplantierten Patienten

Nr.	Alter	Diagnose	Tx-Nr.	Simultan-Tx	Tx-Zeit [Monate]	HD-Zeit [Monate]
1	31	angeborene Fehlbildung der Nieren	1		36	
2	34	Ig A-Nephritis	1		44	18
3	38	Refluxnephropathie	2		155	23
4	39	Diabetes mellitus Typ I	1	Niere/Pankreas	6	24
5	41	chronische Glomerulonephritis	2		61	126
6	42	chronische Glomerulonephritis	2		192	72
7	42	Ig A-Nephritis	1		5	99
8	45	Analgetikanephropathie	2		55	68
9	45	membrano-proliferative Glomerulonephritis	2		58	116
10	46	chronische Glomerulonephritis	2		58	116
11	47	membranoproliferative Glomerulonephritis	1(LS)		26	65
12	47	Ig A-Nephritis	1		13	61
13	47	chronische Glomerulonephritis	1		14	72
14	48	Ig A-Nephritis	1		1	80
15	49	chronische Glomerulonephritis	3		52	
16	53	chronische Glomerulonephritis	1		17	
17	53	Diabetes mellitus Typ I	1		33	94
18	56	interstitielle Nephritis	1		57	76
19	59	Alport-Syndrom	2		192	
20	63	Diabetes mellitus Typ I	1		24	
21	65	chronische Glomerulonephritis	2		50	87
MW					54,7	74,8

Tabelle 1b: Vorerkrankungen, Transplantations- und Hämodialysezeit der weiblichen nierentransplantierten Patienten

Nr.	Alter	Diagnose	Tx.	Simultan-Tx	Tx-Zeit [Monate]	HD-Zeit [Monate]
1	26	Refluxnephropathie	1		2	2
2	32	Refluxnephropathie	1		3	72
3	34	Refluxnephropathie	1		119	
4	34	Diabetes mellitus Typ I	1	Niere/Pankreas	14	16(CAPD)
5	36	Diabetes mellitus Typ I	2	Niere(2)/Pankreas(1)	69	
6	43	Ig A-Nephritis	1		32	46
7	44	Diabetes mellitus Typ I	3	Niere(3)/Pankreas(2)	32	102
8	45	Schrumpfnieren bds.	1		108	149
9	45	chronische Glomerulonephritis	1		2	25
10	45	Diabetes mellitus Typ I	1		17	70
11	50	systemischer Lupus erythematodes	1		28	
12	51	Sklerodermie	1		3	99
13	51	M. Wegener	1		4	100
14	52	Diabetes mellitus Typ I, primäre Amyloidose	1		60	40(CAPD)
15	57	Zystennieren bds.	1		26	42
16	59	M. Wegener, polyzystische Nieren bds.	1		4	94
17	62	chronische Glomerulonephritis	1		9	57
18	63	chronische Glomerulonephritis, Einzelniere rechts	1		43	93
19	69	Diabetes mellitus Typ I, polyzystische Nieren (Potter III)	2	2.Tx: Doppeltransplantation zweier Nieren	200	36
MW					40,8	64,2

zu Tabelle 1a, b: Tx-Zahl=Anzahl der Transplantationen; Tx-Zeit=Transplantationszeit; Simultan-Tx=simultane Transplantation von Niere und Pankreas; HD-Zeit=Dauer der Hämodialyse; LS=Lebendspende

Leerzeilen entsprechen nicht mehr zu erhebenden Daten

Tabelle 2a: Immunsuppressive Therapie der männlichen nierentransplantierten Patienten

Nr.	Medikament 1	Medikament 2	Medikament 3
1			
2	Cyclosporin A		Methylprednison
3	Tacrolimus	MMF	Methylprednison
4		MMF	Methylprednison
5	Tacrolimus	MMF	Methylprednison
6	Cyclosporin A	MMF	Methylprednison
7		MMF	Methylprednison
8	Tacrolimus	MMF	Methylprednison
9	Cyclosporin A	MMF	Methylprednison
10	Tacrolimus	MMF	Methylprednison
11	Cyclosporin A		Methylprednison
12	Cyclosporin A		Methylprednison
13	Tacrolimus	MMF	Methylprednison
14	Cyclosporin A		Methylprednison
15	Tacrolimus	MMF	
16	Cyclosporin A	MMF	Methylprednison
17	Cyclosporin A	MMF	
18		MMF	Methylprednison
19	Cyclosporin A	MMF	Methylprednison
20			Methylprednison
21	Cyclosporin A	MMF	Methylprednison

Tabelle 2b: Immunsuppressive Therapie der weiblichen nierentransplantierten Patienten

Nr.	Medikament 1	Medikament 2	Medikament 3
1	Cyclosporin A	Azathioprin	Methylprednison
2	Cyclosporin A	Azathioprin	Methylprednison
3			
4	Cyclosporin A	MMF	Methylprednison
5	Tacrolimus	MMF	Methylprednison
6		MMF	Methylprednison
7	Tacrolimus	MMF	Methylprednison
8	Cyclosporin A	Azathioprin	Methylprednison
9	Cyclosporin A	Azathioprin	Methylprednison
10		MMF	Methylprednison
11		MMF	Methylprednison
12	Tacrolimus	MMF	Methylprednison
13	Tacrolimus	MMF	Methylprednison
14		MMF	
15		MMF	
16	Sirolimus	MMF	Methylprednison
17	Cyclosporin A	Azathioprin	Methylprednison
18	Sirolimus		Methylprednison
19	Cyclosporin A	MMF	Methylprednison

zu Tabelle 2a, b: Tacrolimus=FK 506; MMF=Mycophenolat Mofetil; Sirolimus=Rapamycin

Leerzeilen entsprechen nicht mehr zu erhebenden Daten

Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ernst Kastenbauer, emeritierter Direktor der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Ludwigs-Maximilians-Universität München, für die Ermöglichung dieser Studie.
Daneben möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Alexander Berghaus, Direktor der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Ludwigs-Maximilians-Universität für die Annahme als Doktorandin herzlich bedanken.
Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Norbert Kleinsasser für die persönliche Betreuung, Beratung und Unterstützung während des gesamten Zeitraumes meiner Dissertation.
Ebenso möchte ich Herrn Dr. Ulrich Harréus für seine Betreuung und Hilfe bei meiner Arbeit danken.
Bedanken möchte ich mich ferner bei Frau Sabina Zieger für die umfassende Beratung und Hilfestellung bei der Arbeit im Labor Klinisch experimentelle Onkologie der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Ludwig-Maximilians-Universität München, wie auch bei Frau Tatjana Baluschko und bei Frau Diplombiologin Dr. hum. biol. Barbara Wallner, die mir während der experimentellen Phase stets mit Rat und Hilfe zur Seite standen.
Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Walter Land, Direktor der Abteilung für Transplantationschirurgie des Klinikums Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München und bei Herrn PD Dr. Helmut Schneeberger, Oberarzt der Abteilung, ohne deren freundliche Unterstützung bei der Gewinnung von Proben und Patientendaten diese Studie nicht möglich gewesen wäre.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Voigts, geb. Spitzweg
Vorname:	Jeanette Marie-Luise
Geburtsdatum:	11. Januar 1976
Geburtsort:	München
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	verheiratet

Schulbildung

1982-1986:	Besuch der Grundschule an der Oberföhringer Straße in München
1986-1995:	Besuch des Edith-Stein-Gymnasiums in München

Studium

1995-1997:	Studium der Rechtswissenschaft an der Ludwig-Maximilians-Universität München
1997-2004:	Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
08/1999:	Ärztliche Vorprüfung
08/2000:	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03/2003:	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05/2004:	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung